

Université de Montréal

Transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés: biocompatibilité, survie et fonction

par

Robert Robitaille

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Docteur ès sciences (Ph.D.)
en sciences biomédicales

Décembre, 2002

© Robert Robitaille, 2002



W

4

U58

2004

V.003

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés: biocompatibilité, survie et fonction

présentée par :
Robert Robitaille

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

L'Hocine Yahia
président-rapporteur

Jean-Pierre Hallé
directeur de recherche

Nathalie Labrecque
membre du jury

Jean-François Yale
examineur externe

représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

La transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés se heurte à deux problèmes majeurs : la biocompatibilité insuffisante des microcapsules et la survie limitée du greffon.

Les objectifs de ce travail de recherche étaient de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogenèse de la réaction de l'hôte contre les microcapsules et d'étudier le rôle du seuil de diffusion membranaire (SDM) et de la restauration partielle du support trophique pancréatique sur la viabilité et la fonction des îlots microencapsulés.

Nous avons démontré qu'un processus dynamique, dont les composantes moléculaires et cellulaires sont modulées dans le temps, survenait à la suite de l'implantation de microcapsules (Chapitres D.1 et D.2). Nous avons confirmé le rôle des macrophages et des granulocytes et l'implication du $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 et $\text{TGF-}\beta_1$ dans la pathogenèse de la réaction de l'hôte contre les microcapsules (Chapitres D.1 et D.2). L'utilisation de la chromatographie par exclusion de taille nous a permis de déterminer le SDM de nos très petites (diamètre $< 350 \mu\text{m}$) microcapsules (Chapitre D.3). De plus, en utilisant des microcapsules planaires (sans poly-L-lysine), nous avons démontré que la survie *in vitro* et la fonction *in vivo* des îlots ne sont pas affectées par le SDM dans l'éventail de valeurs étudiées (Chapitre D.4). Nos résultats suggèrent que la poly-L-lysine, à concentration élevée (0.08 %), a un effet toxique direct sur les cellules en périphérie des îlots. De plus, tant aux concentrations basses (0.01 %) qu'élevées, la poly-L-lysine stimule la réaction de l'hôte contre les microcapsules (Chapitre D.4). L'ajout d'IGF-II, lors de la période de culture *in vitro*, permet d'améliorer la survie des îlots microencapsulés en diminuant la prédisposition à la nécrose et à l'apoptose (Chapitre D.5). Finalement, nous avons démontré que l'amélioration de la qualité de la masse cellulaire *in vitro* provoquait une amélioration de la fonction des îlots microencapsulés *in vivo* (Chapitre D.5). Ceci permet de réduire de moitié, le nombre d'îlots microencapsulés nécessaires pour induire la normoglycémie.

La réalisation de ce travail nous a permis de proposer des stratégies et des solutions afin de surmonter les embûches qui limitent l'application clinique de la transplantation d'îlots microencapsulés.

Mots clés

Diabète de Type 1, Microencapsulation, Alginate, Survie Cellulaire, Mort Cellulaire, Apoptose, Nécrose, « Insulin-Like Growth Factor-II », Cytokines, Perméabilité.

ABSTRACT

Microencapsulated islet transplantation is impeded by two major obstacles : insufficient biocompatibility of microcapsules and limited graft survival. In addition, one important question needs to be answer : what is the influence of molecular weight cut-off (MWCO) on microencapsulated cell survival?

The goals of this research were to study the cellular and molecular mechanisms implicated in the pathogenesis of the host reaction to microcapsules, to determine the effect of MWCOs on microencapsulated islet survival and to evaluate the effect of partial re-establishment of the pancreatic trophic support on microencapsulated islet survival and function.

We have shown that the host reaction to microcapsules is a dynamic process (Chapters D.1 et D.2). Molecular and cellular reactions are induced by microcapsule implantations and are modulated with time (Chapters D.1 et D.2). We have confirmed the role of macrophages and polymorphonuclears in this reaction (Chapters D.1 et D.2). We have shown that cytokines, in particular TNF- α , IL-1 β , IL-6 et TGF- β_1 , are implicated in the pathogenesis of the host reaction to microcapsules (Chapters D.1 et D.2). The MWCO of our small microcapsules (diameter < 350 μ m) was determined using size exclusion chromatography (Chapter D.3). We have observed no differences in the incidence and duration of the normoglycemia after transplantation of islets encapsulated in medium MWCO poly-L-lysine (PLL)-free versus high MWCO PLL-free microcapsules (Chapter D.4). We have shown that 0.08 % PLL has a direct toxicity on islets embedded in alginate and that 0.08 % and 0.01 % PLL trigger an *in vivo* host reaction against microcapsules (Chapter D.4). *In vitro* IGF-II incubation significantly improves islet cell viability in a dose-dependent fashion by reducing apoptosis and necrosis (Chapter D.5). Finally, we have shown that this improvement in islet cell mass promoted *in vivo* islet cell survival and allowed successful transplantation using a smaller number of microencapsulated islets (Chapter D.5).

The realization of this work allowed us to propose strategies and solutions to overcome the problems that hindered the clinical application of microencapsulated islet transplantation.

Key words

Diabetes Mellitus, Microencapsulation, Alginate, Cell Survival, Cell Death, Apoptosis, Necrosis, Insulin-Like Growth Factor-II, Cytokines, Permeability.

TABLE DES MATIÈRES

<i>RÉSUMÉ</i>	<i>III</i>
<i>MOTS CLÉS</i>	<i>IV</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>V</i>
<i>KEY WORDS</i>	<i>VI</i>
<i>TABLE DES MATIÈRES</i>	<i>VII</i>
<i>LISTE DES FIGURES</i>	<i>XI</i>
<i>LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</i>	<i>XII</i>
<i>DÉDICACE</i>	<i>XV</i>
<i>REMERCIEMENTS</i>	<i>XVI</i>
<i>A. INTRODUCTION</i>	<i>1</i>
<i>A.1. THÉRAPIE CELLULAIRE POUR LE DIABÈTE DE TYPE 1</i>	<i>1</i>
A.1.1. Diabète de type 1	1
A.1.1.1. Pathogenèse du diabète auto-immun	1
A.1.2. Transplantation d'îlots de Langerhans	3
A.1.3. L'obstacle de l'immunosuppression	3
<i>A.2. IMMUNOISOLEMENT</i>	<i>3</i>
A.2.1. Concept de l'immunoisolement	3
A.2.2. Les types de pancréas bio-artificiels	4
<i>A.3. MICROENCAPSULATION</i>	<i>4</i>
A.3.1. Définition de la microencapsulation	4
A.3.2. Polymères utilisés dans la fabrication des microcapsules	5

A.3.3. Méthode de fabrication des microcapsules par complexation de polyélectrolytes	6
A.3.3.1. Description de la technique de formation des microcapsules d'alginate-poly-L-lysine	8
A.3.3.1.1. Modifications de la technique	8
<u>A.4. PROPRIÉTÉS DES MICROCAPSULES ET DES ÎLOTS MICROENCAPSULÉS.....</u>	9
A.4.1. Résistance à la dégradation mécanique.....	9
A.4.1.1. Méthodes d'analyse de la durabilité.....	9
A.4.2. Perméabilité et seuil de diffusion membranaire.....	10
A.4.2.1. Méthode d'analyse de la perméabilité.....	10
A.4.2.2. Méthodes d'analyse du SDM	10
A.4.3. Biocompatibilité des îlots microencapsulés.....	11
A.4.3.1. L'interaction entre l'hôte et les biomatériaux	12
A.4.3.1.1. Nécessité de purifier l'alginate.....	12
A.4.3.1.2. Influence des caractéristiques physico-chimiques des microcapsules	13
A.4.3.1.3. Modèle <i>in vivo</i> pour étudier la biocompatibilité	13
A.4.3.2. L'interaction entre l'hôte et le greffon	14
A.4.3.2.1. Réaction immunitaire spécifique par reconnaissance directe des antigènes	14
A.4.3.2.2. Réaction immunitaire spécifique par reconnaissance indirecte des antigènes.....	15
A.4.3.2.3. Réaction immunitaire non-spécifique	16
A.4.3.2.4. Modèles <i>in vivo</i> pour étudier l'efficacité de l'immunoprotection.....	16
A.4.3.3. L'interaction entre les biomatériaux et le greffon.....	17
A.4.3.3.1. Effet des caractéristiques chimiques des biomatériaux.....	17
A.4.3.3.2. Influence de la microcapsule elle-même.....	18
A.4.3.4. Conséquences de la réponse biologique contre les îlots microencapsulés.....	18
A.4.3.4.1. Rôle du complément.....	18
A.4.3.4.2. Rôle des cellules.....	19
A.4.3.4.2.1. Barrière physico-métabolique à la diffusion	20
A.4.3.4.3. Rôle des médiateurs cellulaires	20

A.4.3.4.3.1. Immunoprotection inadéquate contre certains médiateurs cellulaires	21
<u>A.5. PROBLÉMATIQUE DE LA MASSE CELLULAIRE TRANSPLANTÉE.....</u>	<u>21</u>
A.5.1. Diminution de la masse d'îlots transplantés	22
A.5.1.1. Diffusion réduite des nutriments	22
A.5.1.2. Importance du support trophique fourni par le pancréas.....	22
A.5.1.2.1. Mécanismes biochimiques	23
A.5.1.2.2. Rôle du microenvironnement pancréatique.....	23
A.5.1.2.2.1. Matrice extracellulaire.....	23
A.5.1.2.2.2. Cellules épithéliales canaliculaires pancréatiques.....	24
A.5.1.2.3. IGF-II est un facteur de survie	24
A.5.1.2.3.1. IGF-II est un membre du système IGF.....	25
A.5.1.2.3.2. Voies de signalisation des récepteurs de l'IGF-II	26
<u>B. HYPOTHÈSES.....</u>	<u>32</u>
<u>B.1. RAISONNEMENT.....</u>	<u>32</u>
B.1.1. Hypothèse 1 (Objectifs 1 et 2).....	32
B.1.2. Hypothèse 2 (Objectifs 3 et 4).....	32
B.1.3. Hypothèse 3 (Objectif 5)	33
<u>C. OBJECTIFS.....</u>	<u>34</u>
<u>C.1. OBJECTIF 1.....</u>	<u>34</u>
<u>C.2. OBJECTIF 2.....</u>	<u>34</u>
<u>C.3. OBJECTIF 3.....</u>	<u>34</u>
<u>C.4. OBJECTIF 4.....</u>	<u>35</u>
<u>C.5. OBJECTIF 5.....</u>	<u>35</u>
<u>D. ÉTUDES.....</u>	<u>36</u>
<u>D.1. ÉTUDE 1. TIME COURSE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-β_1 (TGF-β_1)</u>	
<u>MRNA EXPRESSION IN THE HOST REACTION TO ALGINATE-POLY-L-LYSINE</u>	

<u>MICROCAPSULES FOLLOWING IMPLANTATIONS INTO RAT EPIDIDYMAL FAT PADS.....</u>	<u>36</u>
<u>D.2. ÉTUDE 2. PERITONEAL CELLULAR AND MOLECULAR REACTIONS FOLLOWING SALINE AND ALGINATE-POLY-L-LYSINE MICROCAPSULE INJECTIONS.....</u>	<u>56</u>
<u>D.3. ÉTUDE 3. STUDIES ON SMALL (<350 μM) ALGINATE-POLY-L-LYSINE MICROCAPSULES. V. DETERMINATION OF CARBOHYDRATE AND PROTEIN PERMEATION THROUGH MICROCAPSULES BY REVERSE-SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY.....</u>	<u>88</u>
<u>D.4. ÉTUDE 4. EFFECT OF MEMBRANE MOLECULAR WEIGHT CUT-OFF (MWCO) ON MICROENCAPSULATED ISLETS SURVIVAL</u>	<u>114</u>
<u>D.5. ÉTUDE 5. IGF-II ALLOWS PROLONGED BLOOD GLUCOSE NORMALIZATION WITH A REDUCED ISLET CELL MASS TRANSPLANTATION.....</u>	<u>148</u>
<u>E. DISCUSSION GÉNÉRALE.....</u>	<u>191</u>
<u>E.1. BIOCOMPATIBILITÉ DES ÎLOTS MICROENCAPSULÉS.....</u>	<u>191</u>
<u>E.2. PERMÉABILITÉ DES MICROCAPSULES.....</u>	<u>196</u>
<u>E.3. MASSE CELLULAIRE TRANSPLANTÉE.....</u>	<u>199</u>
<u>E.4. AUTRES CONSIDÉRATIONS ESSENTIELLES POUR ASSURER L'AVENIR DE LA TRANSPLANTATION D'ÎLOTS DE LANGERHANS MICROENCAPSULÉS.....</u>	<u>203</u>
<u>F. CONCLUSION</u>	<u>204</u>
<u>G. SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>206</u>
<u>ANNEXES.....</u>	<u>XVIII</u>

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Concept de la microencapsulation.	7
Figure 2 : Schématisation des voies de signalisation intracellulaire responsables des effets antiapoptotiques de l'IGF-II (page suivante).	28
Figure 3 : Schématisation des voies de signalisation intracellulaire responsables des effets mitogènes de l'IGF-II (page suivante).	30

LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

\equiv :	égal
$>$:	plus grand
$<$:	plus petit
\geq :	plus grand ou égal
\leq :	plus petit ou égal
% :	pourcentage
α :	alpha
β :	bêta
γ :	gamma
κ :	kappa
ADN :	acide désoxyribonucléique
AN69 :	copolymères d'acrylonitrile
APC :	cellule présentatrice d'antigènes
Ba ²⁺ :	baryum
BAD :	protéine proapoptotique « Bcl-2 associated protein D »
BAX :	protéine proapoptotique « Bcl-2 associated protein X »
Bcl-2 :	protéine antiapoptotique « B cell leukemia proto-oncogene »
Bcl-X _L :	protéine antiapoptotique « Bcl-2 associated protein X _L »
C3b :	composé C3 tronqué
Ca ²⁺ :	calcium
CD :	« cluster of differentiation » (classe de différenciation)
c-fos :	facteur de transcription du proto-oncogène cellulaire fos
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CREB :	facteur de transcription « cAMP response element binding protein »
Cyt C :	cytochrome C
d :	diamètre
eIF4 :	facteur d'initiation de la traduction « eukaryotic initiation factor 4 »
eIF4-BP1 :	« eIF4E binding protein, PHAS-I »
elk1 :	facteur de transcription de la famille de l'oncoprotéine Ets
ERK :	« extracellular regulated kinase »

etc. :	et cetera
FGF :	« fibroblast growth factor » (facteur de croissance des fibroblastes)
G :	acide L-guluronique
GAD65 :	isoforme 65 de la « glutamic acid decarboxylase »
Grb2 :	molécule adaptatrice « growth factor receptor-bound protein 2 »
GRO :	« growth-regulated oncogene »
HEMA-MMA :	poly(hydroxyethylmetacrylate-methyl methacrylate)
HLA :	« human leukocyte antigen »
IA-2 :	protéine-tyrosine phosphatase transmembranaire IA-2
I- κ B :	inhibiteur de NF- κ B
I κ -K :	kinase de I- κ B
IFN :	interféron
IGF :	« insulin-like growth factor »
IGFBP :	« IGF binding protein » (protéine de liaison de l'IGF)
IGFBP-rP :	« IGFBP related protein »
IL :	interleukine
iNOS :	« inducible nitric oxide synthase »
IRS :	« insulin receptor substrat »
JNK :	« c-jun N-terminal kinase »
kDa :	kilo Dalton
K _{sec} :	coefficient de séparation
M :	acide D-mannuronique
MAPK :	« mitogen-activated protein kinase »
MCP:	« monocyte chemotactic protein »
MEK :	« MAP/ERK kinase »
MEKK :	« MEK kinase »
MIP :	« macrophage inflammatory protein »
μ m :	micromètre
mTOR :	kinase « mammalian target of rapamycin »
MWCO :	« molecular weight cut-off » (seuil de diffusion membranaire)
NF- κ B :	facteur de transcription « nuclear factor- κ B »
NO :	monoxyde d'azote
O ₂ ⁻ :	superoxyde

P14-3-3 :	protéine 14-3-3
p38 :	kinase « 38 kDa protein »
p70/s6k :	« 70 kDa protein or S6 kinase »
p90/rsk :	« 90 kDa protein or ribosome subunit kinase »
PCR :	« polymerase chain reaction » (réaction d'amplification en chaîne)
PDGF :	« platelet-derived growth factor » (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PDK :	« phosphatidylinositol-dependent kinase »
PI3K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PKB/Akt :	protéine kinase B/Akt
PLL ::	poly-L-lysine
PEG :	polyethyleneglycol
P _m :	perméabilité membranaire
RANTES :	« regulated on activation, normal T cell expressed and secreted »
Raf :	sérine/thréonine kinase cytoplasmique du proto-oncogène cellulaire raf
Ras :	protéine G du proto-oncogène cellulaire ras
R-I :	récepteur de type I (IGF-I)
R-II :	récepteur de type II (IGF-II)
RHM:	réaction de l'hôte contre les microcapsules
R-Ins :	récepteur à l'insuline
RT :	« reverse transcription » (réaction de transcription inverse)
SDM :	seuil de diffusion membranaire
SOD :	superoxyde dismutase
SHC :	« SH2-containing protein »
SOS :	« guanine nucleotide exchange factor son-of-sevenless-1 protein »
TGF :	« transforming growth factor » (facteur de croissance transformant)
Th :	« T helper » (cellule T-auxiliaire)
TNF :	« tumor necrosis factor » facteur nécrosant les tumeurs)
TRAF-2 :	« TNF-receptor associated factor-2 »
U :	vitesse de transfert

DÉDICACE

À Logan, tes p etits yeux qui s'émerveillent lors de tes découvertes sont pour moi une source d'inspiration, de réconfort et de bonheur.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier premièrement et sincèrement mon directeur scientifique, le Professeur Jean-Pierre Hallé, pour m'avoir permis d'entreprendre ce stage de doctorat dans son laboratoire. Le Dr Hallé m'a initié à la démarche scientifique en m'apportant la profondeur et la rigueur essentielles à cette démarche. De plus, ses précieux conseils, ses grandes connaissances, sa vaste expérience et son sens critique aiguisé ont grandement aidé à la réalisation de ce travail et à faire de moi un meilleur chercheur.

Je remercie également Nathalie Henley, coordinatrice du laboratoire, et le Dr François Leblond, du Centre de Recherche Guy-Bernier, d'avoir pris le temps de m'initier au travail en laboratoire. De plus, leur nombreux conseils et nombreuses critiques m'ont beaucoup aidé et continueront à m'aider dans mes expériences futures. Je dois aussi insister sur l'appui de la formidable équipe de recherche du Dr Hallé. Karine, Julie, Martin et Sandy m'ont épaulé tout au long de mes études.

Je tiens à souligner la grande contribution du Dr Lawrence Rosenberg, de l'Université McGill. C'est grâce à sa vaste expérience et ses nombreux conseils que nous avons entrepris des travaux sur le rôle du support trophique du pancréas sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés.

Je remercie le Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et le Fond pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) de m'avoir accordé un soutien financier. La bourse de doctorat s'est avérée essentielle pour la poursuite de mes études et la réalisation de ce travail.

Je réserve un merci spécial à mes parents, Robert et Denise, ainsi qu'à mes deux soeurs, Isabelle et Myriam. Ils ont été pour moi le meilleur exemple de courage et de persévérance. Ils m'ont toujours épaulé et encouragé à poursuivre des études universitaires. Leur soutien a été un atout important dans la réussite de mes objectifs.

Je dois offrir un petit merci à mon petit garçon. Logan, ton entrain et ta gaieté ont été pour moi une source essentielle et agréable de distraction. De plus, ton immense curiosité, jamais satisfaite, me servira toujours de modèle.

Finalement, je remercie grandement ma conjointe Sabrina. Elle m'a soutenue financièrement et surtout moralement depuis le début de notre vie commune. Elle a partagé mes joies, mes peines, mes succès et mes échecs. De plus, elle m'a offert beaucoup d'affection et de réconfort et m'a toujours encouragé à persévérer. C'est à cause d'elle que j'ai continué jusqu'au bout. Mille fois merci Sabrina, ta patience sera bientôt récompensée...

A. INTRODUCTION

A.1. Thérapie cellulaire pour le diabète de type 1

A.1.1. Diabète de type 1

Dans le monde industrialisé, le diabète est la maladie endocrinienne dont la prévalence est la plus élevée ¹. Cliniquement, la classification du diabète se résume en deux catégories : 1- le diabète de type 1 (autrefois nommé diabète juvénile ou diabète insulino-dépendant) et 2- le diabète de type 2 (autrefois nommé diabète adulte ou diabète non-insulino-dépendant). Le diabète de type 1 est causé par la destruction totale des cellules β qui sécrètent l'insuline et qui sont regroupées dans les îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline, sécrétée en réponse à l'augmentation de la glycémie, est une hormone hypoglycémisante qui favorise l'absorption, le métabolisme et l'entreposage du glucose par les tissus périphériques. La destruction des cellules β provoque donc une déficience absolue de l'insuline et une perturbation de l'homéostasie du glucose. Plusieurs preuves suggèrent que le diabète de type 1 est une maladie auto-immune : 1- la présence d'une inflammation des îlots avec infiltration leucocytaire (insulite) ², 2- le lien génétique entre le diabète de type 1 et certains allèles du complexe HLA ³ et 3- la présence d'autoanticorps dirigés contre des autoantigènes provenant des cellules β ^{4,5}.

A.1.1.1. Pathogenèse du diabète auto-immun

L'étiologie du diabète de type 1 est complexe et partiellement connue. Des études de liaison génétique ont permis de révéler la présence de facteurs de susceptibilité dont les génotypes DQ et DR du complexe HLA de classe II sont les plus forts déterminants génétiques ³. Cependant, le taux de concordance inférieur à 50 % chez des vrais jumeaux ⁶, insinue que la combinaison des gènes de susceptibilité et de facteurs environnementaux (agents chimiques ou agents infectieux comme les virus ^{7,8} est importante pour le développement du diabète de type 1. La réponse auto-immune est exclusivement dirigée contre les cellules β , ce qui suggère un rôle des autoantigènes dans la réaction ⁹. Les principaux autoantigènes provenant de la cellule β sont : l'isoforme 65 de la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD65), la protéine tyrosine phosphatase transmembranaire IA-2 et

l'insuline ^{4,5,9}. Plusieurs mois et années avant le développement de la maladie, près de 90 % des patients diabétiques possèdent des autoanticorps spécifiques contre l'un ou plusieurs des principaux autoantigènes ^{4,5,9}.

L'infiltration cellulaire des îlots est composée d'une population hétérogène de cellules immunitaires dont les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) ⁹⁻¹². Il existe deux principaux mécanismes menant à la destruction des cellules β : 1- la voie directe et 2- la voie indirecte. Dans la voie directe, les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ reconnaissent les autoantigènes présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules β ⁹⁻¹². Cette interaction mène à la régulation à la hausse des molécules de co-stimulation qui provoquent une cascade de signaux transducteurs dont le résultat est la mort des cellules β par apoptose (via les voies FAS/FASL et perforine/granzyme) ⁹⁻¹². Dans la voie indirecte, les autoantigènes sécrétés sont captés par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) et présentés, par les CMH de classe II, aux lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ naïfs ($Th0$) ⁹⁻¹². Cette interaction mène à la différenciation, qui est amplifiée par la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12) par les APCs, des $Th0$ en $Th1$. Les lymphocytes $Th1$ sécrètent des cytokines, l'IL-2 et l'interféron-gamma γ (IFN- γ), qui provoquent indirectement l'apoptose des cellules β via la stimulation de la sécrétion de perforine/granzyme par les $CD8^+$ spécifiques et la sécrétion de TNF- α et de radicaux libres (superoxide O_2^-) par les macrophages ⁹⁻¹². De plus, les lymphocytes $Th1$ provoquent directement l'apoptose des cellules β via la voie FAS/FASL. Les lymphocytes B semblent jouer principalement le rôle d'APCs dans la voie indirecte ⁹⁻¹². Cependant, les autoanticorps qu'ils sécrètent pourraient induire une réaction cellulaire cytotoxique via un mécanisme qui dépend des anticorps et qui implique des lymphocytes T autoréactifs.

L'initiation de la réponse auto-immune fait l'objet de plusieurs hypothèses : 1- la perturbation du phénomène de tolérance extrathymique (« peripheral tolerance ») ⁸, 2- le concept d'imitation moléculaire (« molecular mimicry ») ⁸, 3- le concept de super-antigène ⁸, 4- le concept d'activation non-antigénique (« bystander ») ^{8,13}, 5- le concept d'apoptose des cellules β néonatales ¹⁴ et 6- le concept d'apoptose des cellules β en présence d'inflammation ¹¹.

A.1.2. Transplantation d'îlots de Langerhans

Afin de traiter la déficience absolue en insuline associée au diabète de type 1, le seul traitement disponible pour la majorité des patients diabétiques est un traitement palliatif. L'insulinothérapie intensive reproduit partiellement le contrôle physiologique de la glycémie par les cellules β . L'administration d'insuline exogène ne fait donc que retarder l'apparition des complications morbides et mortelles du diabète de type 1^{15,16}. Le remplacement des cellules β détruites représente le traitement ultime pour le diabète de type 1¹. De nos jours, la transplantation de pancréas et la transplantation d'îlots de Langerhans représentent les seuls traitements qui permettent d'éliminer l'utilisation d'insuline exogène. Les récents succès du groupe d'Edmonton^{17,18}, corroborés par d'autres groupes¹⁹, font en sorte que la transplantation d'îlots est maintenant considérée comme une option pour le traitement du diabète de type 1 chez l'humain. En guise d'une solution de rechange à la transplantation de pancréas, la transplantation d'îlots offre plusieurs avantages potentiels²⁰⁻²⁴. Par exemple, c'est une chirurgie minimalement invasive qui pourrait être pratiquée dans le cadre d'un programme de soins ambulatoires.

A.1.3. L'obstacle de l'immunosuppression

Cependant, ce traitement, comme toutes les greffes d'organes, nécessite la prise chronique, par voie systémique, de médicaments immunosuppresseurs très puissants. Ceux-ci entraînent une morbidité et une mortalité importante dues en partie à la suppression non spécifique du système immunitaire (associée à une variété de complications non désirées comme des infections opportunistes, une surveillance tumorale déficiente et une toxicité rénale). Donc, encore de nos jours, la sélection des patients est très contingentée et se limite aux diabétiques adultes labiles (présentant des comas hypoglycémiques et/ou des acidocétoses à répétition), déjà greffés ou en attente d'une greffe rénale^{17,19,25,26}.

A.2. Immunoisolement

A.2.1. Concept de l'immunoisolement

Le concept derrière la technologie de l'encapsulation date du début des années 40 et se nomme l'immunoisolement. Il se définit par la séparation de cellules ou tissus

transplantés du système immunitaire par une membrane semi-perméable. Cette membrane semi-perméable permet la diffusion des molécules essentielles pour la survie et la fonction des cellules du transplant, tout en empêchant le système immunitaire de détecter et de réagir à la présence du transplant ²⁷⁻²⁹. L'objectif principal est de transplanter des cellules à travers une barrière immunologique sans l'utilisation d'immunosuppresseurs. En théorie, l'immunoisolement permettrait d'éliminer les complications reliées à l'immunosuppression. Ainsi, il serait moralement acceptable de transplanter des îlots encapsulés chez un enfant ou tout autre diabétique afin de prévenir l'apparition des complications morbides et mortelles reliées au diabète. Plusieurs études démontrent la faisabilité à transplanter des cellules encapsulées pour le traitement de diverses pathologies endocrines ³⁰⁻³⁶. Chick fut le premier à utiliser le concept d'immunoisolement afin de traiter le diabète de type 1 et c'est lui qui inventa le terme pancréas bioartificiel ^{37,38}.

A.2.2. Les types de pancréas bio-artificiels

Les dispositifs d'encapsulation peuvent être séparés en deux grandes catégories : 1- dispositifs de macroencapsulation ou macrocapsules et 2- dispositifs de microencapsulation ou microcapsules. Les dispositifs de macroencapsulation renferment la masse cellulaire totale (plusieurs îlots) à l'intérieur d'une seule membrane semi-perméable ³⁹. Les dispositifs de macroencapsulation peuvent être séparés en deux catégories : 1- vasculaires ou 2- extravasculaires. Les dispositifs de macroencapsulation de type vasculaire sont généralement composés d'un tube microporeux anastomosé aux vaisseaux sanguins (chirurgie invasive) où le sang passe par la lumière du tube et les îlots se situent dans une enveloppe à l'extérieur du tube ^{37,38}. Les dispositifs extravasculaires fonctionnent selon le principe d'une chambre à diffusion ⁴⁰ et sont généralement plats (mince et fragile) de forme circulaire ⁴¹⁻⁴⁴ (disque) ou très allongée (« hollow-fibres ») ⁴⁵⁻⁴⁸.

A.3. Microencapsulation

A.3.1. Définition de la microencapsulation

La microencapsulation est une technique par laquelle une masse cellulaire réduite (un ou quelques îlots) est incluse à l'intérieur de sa propre membrane semi-perméable de

forme sphérique ^{39,49} (Figure 1). Plusieurs arguments recommandent l'utilisation des microcapsules par rapport aux macrocapsules. Par exemple, la forme sphérique est associée à un meilleur ratio surface sur volume ce qui améliore la capacité de diffusion (donc une meilleure oxygénation des îlots). De plus, les microcapsules sont stables mécaniquement, peuvent être produites de façon simple et abordable et peuvent être implantées dans un patient par une simple injection (chirurgie minimalement invasive). Des études précliniques chez des rongeurs ^{30,50,51}, des chiens ^{52,53} et des singes ⁵⁴ diabétiques ont démontré que la microencapsulation s'avérait efficace pour prévenir la destruction, par le système immunitaire, des îlots transplantés et permettait de normaliser la glycémie à plus ou moins long terme. Cependant, l'expérience clinique est limitée à un seul patient ⁵⁵.

A.3.2. Polymères utilisés dans la fabrication des microcapsules

La plupart des microcapsules sont fabriquées à partir de polymères capables de former des hydrogels. Les hydrogels possèdent plusieurs caractéristiques avantageuses pour la microencapsulation : **1-** la souplesse et la flexibilité qui réduisent l'irritation mécanique ou la friction avec les tissus environnants ³⁹, **2-** les propriétés hydrophiles qui font que la tension de surface (« interfacial tension ») est presque nulle avec les tissus et les fluides environnants, ce qui réduit l'adsorption de protéines et l'adhérence des cellules immunitaires ³⁹ et **3-** la perméabilité élevée envers les molécules de faibles poids moléculaires (comme les nutriments et métabolites) qui présente un avantage du point de vue de la diffusion (« mass transport ») ³⁹. Les polymères utilisés peuvent être synthétiques [poly(hydroxyethylmetacrylate-methyl methacrylate) ou HEMA-MMA ⁵⁶, copolymères d'acrylonitrile ou AN69 ⁴⁷, polyéthylenglycol ou PEG ⁵⁷, etc.] ou naturels (alginate ³⁰, chitosan ⁵⁸, agarose ⁵⁹, etc.). En principe, les polymères synthétiques peuvent être produits selon des besoins précis, de façon contrôlée et très reproductible et sont souvent insolubles dans l'eau (microcapsules plus stables *in vivo*). Cependant, pour fabriquer des microcapsules à l'aide de polymères synthétiques, il faut généralement utiliser des conditions excessives (pH acide, température élevée) et des solvants organiques incompatibles avec la fonction cellulaire ^{60,61}. Les îlots de Langerhans renferment des cellules fragiles incapables de proliférer et avec un potentiel de régénération faible, ce qui veut dire que le processus d'encapsulation et de polymérisation devrait se faire dans des conditions expérimentales physiologiques (pH neutre, température ambiante, solutions

aqueuses, etc.). L'alginate est le polymère naturel (provenant des algues) le plus utilisé, car il permet un processus de fabrication dans des conditions physiologiques. De plus, même si l'alginate est soluble dans les solutions aqueuses, des microcapsules à base d'alginate peuvent être stables pendant des années *in vivo* ⁶².

A.3.3. Méthode de fabrication des microcapsules par complexation de polyélectrolytes

Généralement, toutes les méthodes de microencapsulation ont le même schème de fabrication. Premièrement, on génère une bille par un processus qui permet de contrôler le diamètre de la bille. Ensuite, à l'aide d'un processus interfacial, la bille est stabilisée et solidifiée par la formation d'une membrane semi-perméable en périphérie. Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer des microcapsules ^{39,63}. La microencapsulation, par complexation de polyélectrolytes, est une méthode simple pour former une barrière semi-perméable autour des cellules vivantes. Elle est caractérisée par l'interaction de polymères de charges opposées. Ceux-ci étant solubles en milieu aqueux, ils permettent l'encapsulation dans des conditions compatibles avec le milieu cellulaire. La complexation de l'alginate (polyanion) et de la poly-L-lysine (polycation), initialement proposée par Lim et Sun pour l'encapsulation des îlots de Langerhans ³⁰, est la technique de fabrication de microcapsules à base d'alginate la plus fréquemment étudiée et utilisée.

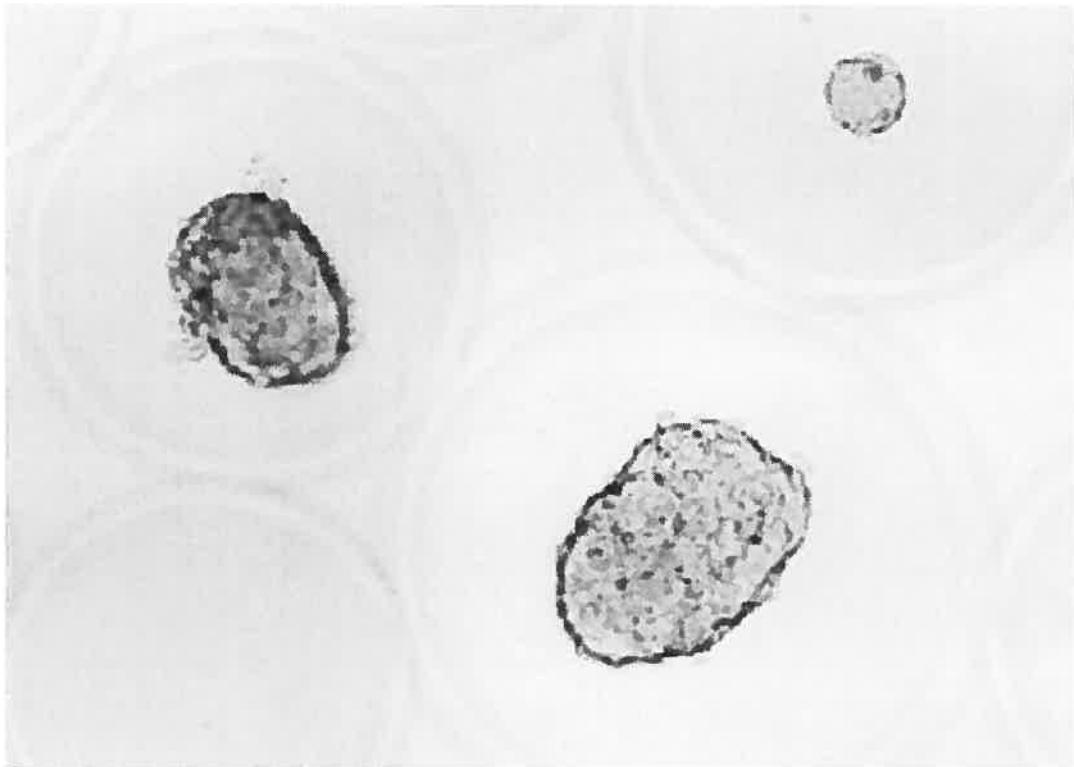


Figure 1 : Concept de la microencapsulation.

Photomicrographie représentant des îlots de rats Wistar microencapsulés. Les microcapsules d'alginate poly-L-lysine, fabriquées à l'aide d'un générateur d'impulsions électrostatiques, ont une taille très petite et ne présentent aucune imperfection morphologique visible. Grossissement 100 X.

A.3.3.1. Description de la technique de formation des microcapsules d'alginate-poly-L-lysine

Cette technique est basée sur l'enrobage des îlots à l'intérieur de billes d'alginate qui seront gélifiées par contact avec une solution riche en cations multivalents (généralement les cations sont divalents et le calcium (Ca^{2+}) est couramment utilisé). Les molécules d'alginate sont des polysaccharides anioniques composés de homopolymères d'acides D-mannuroniques (M) et d'acides L-guluroniques (G) séparés par des régions mixtes (MG). Elles peuvent être réticulées par l'interaction du Ca^{2+} et des séquences riches en G. Les billes sont produites par extrusion de la solution d'alginate à travers une aiguille. L'extrusion peut être facilitée par une buse à pression d'air (« air-jet ») ⁶⁴ ou par un générateur d'impulsions électrostatiques, dont l'avantage est de préparer de très petites microcapsules ($< 300 \mu\text{m}$) ⁶⁵. Après gélification, les billes d'alginate sont incubées dans une solution de poly-L-lysine (PLL) afin de réduire la perméabilité et ainsi former la membrane semi-perméable. La PLL se lie à des séquences mixtes en M et G ce qui induit la formation de complexes, à la surface des microcapsules, constitués d'hélices- α de PLL entourées de superhélices de chaînes de polysaccharides ⁶⁶. Afin d'améliorer la biocompatibilité, les microcapsules sont incubées dans une solution d'alginate diluée pour masquer toutes les molécules résiduelles de PLL encore exposées à la surface.

A.3.3.1.1. Modifications de la technique

D'innombrables paramètres peuvent être modulés afin de produire différentes microcapsules. Par exemple, le type d'alginate, le type d'extrusion, le type de cation divalent, le poids moléculaire de la PLL, le temps des incubations et la concentration des réactifs peuvent tous influencer diverses caractéristiques des microcapsules comme la taille, la perméabilité membranaire, la résistance à la dégradation mécanique et la biocompatibilité. Une modification, qui suscite beaucoup d'intérêts, est la gélification de l'alginate avec le baryum (Ba^{2+}) et l'omission de la PLL ^{67,68}. Le Ba^{2+} a beaucoup plus d'affinités pour l'alginate que le Ca^{2+} . De plus, le Ba^{2+} ne lie pas que les molécules G de l'alginate, il lie aussi les molécules M ³⁹. Les billes d'alginates de baryum sont plus

réticulées et donc plus stables *in vivo*. On définit les microcapsules sans membrane de PLL comme des microcapsules planaires.

A.4. Propriétés des microcapsules et des îlots microencapsulés

A.4.1. Résistance à la dégradation mécanique

L'évaluation de la résistance des microcapsules est importante, non seulement pour déterminer la durabilité des microcapsules durant la production et la manipulation mais aussi comme une indication de l'intégralité de la membrane semi-perméable. Bien que la résistance à la dégradation mécanique soit reconnue pour être un facteur limitant pour les applications *in vivo*, cette propriété est rarement étudiée, quantifiée et rapportée dans la littérature.

A.4.1.1. Méthodes d'analyse de la durabilité

Bien que non quantitatives et peu fiables, les mesures de l'épaisseur de la membrane semi-perméable et du pourcentage de gonflement de la microcapsule sont couramment utilisées afin de prédire de façon théorique la durabilité ^{69,70}. Certains auteurs évaluent de façon qualitative la résistance à la dégradation mécanique en pinçant les microcapsules avec des micropinces de chirurgie ⁷¹. La mesure de la force nécessaire pour causer la rupture des microcapsules à la suite de l'application d'une pression unie axiale (« penetrometer ») est une façon complexe de mesurer la résistance à la dégradation mécanique ⁷². Cette technique s'effectue sur une microcapsule à la fois et dépend de la vitesse d'application de la pression uniaxiale et de la capacité de détecter la rupture. La force de rupture dépend autant de la résistance et de l'épaisseur de la membrane que des caractéristique du cœur de la microcapsule (viscosité, pourcentage de réticulation, etc.). Une façon beaucoup plus simple d'évaluer la durabilité des microcapsules est de soumettre la population de microcapsules à une force de cisaillement (« shear-flow ») ⁷³⁻⁷⁵. La fraction des microcapsules brisées, observée visuellement ^{74,75} ou par dosage d'une substance relâchée lors du bris ⁷³, peut être utilisée comme une mesure simple de la résistance à la dégradation mécanique. Cette technique peut facilement être utilisée pour évaluer l'effet d'améliorations du design des microcapsules sur la durabilité et la résistance à la

dégradation mécanique. L'augmentation de la concentration et du temps d'incubation avec la PLL, de la concentration, du ratio G/M et de la viscosité de l'alginate et l'utilisation de cations ayant plus d'affinités pour l'alginate contribuent à améliorer la résistance à la dégradation mécanique. De plus, des méthodes sont aussi à l'étude afin de renforcer le lien de la PLL avec l'alginate (transformation du lien électrostatique en un lien covalent).

A.4.2. Perméabilité et seuil de diffusion membranaire

La perméabilité (dimension des pores) des microcapsules détermine l'apport en nutriments essentiels et l'évacuation des déchets métaboliques toxiques ³⁹. Le seuil de diffusion membranaire (SDM) détermine la taille de la limite supérieure du transport moléculaire ³⁹. La survie des îlots microencapsulés dépend d'un équilibre optimal entre la perméabilité des microcapsules et le SDM. Tout comme la résistance à la dégradation mécanique, la perméabilité et le SDM des microcapsules sont rarement étudiés, quantifiés et rapportés dans la littérature.

A.4.2.1. Méthode d'analyse de la perméabilité

Un devis expérimental simple pour déterminer la perméabilité des microcapsules est d'équilibrer un ensemble (relativement petit) de microcapsules avec une molécule d'intérêt et de quantifier dans le temps sa pénétration ⁷⁶ ou sa diffusion (sortie) à partir de microcapsules saturées ⁷⁷. Cette méthode permet de calculer une vitesse de transfert (U) pour une molécule donnée. À partir des dimensions physiques d'une microcapsule (diamètre, surface, épaisseur de la membrane semi-perméable), la perméabilité membranaire (P_m) peut être calculée selon la formule $P_m = U \times d$ (où d est le diamètre de la microcapsule). Celle-ci est calculée à partir d'une très petite quantité de microcapsules qui appartiennent à la moyenne. Une hétérogénéité des dimensions physiques peut grandement affecter les résultats.

A.4.2.2. Méthodes d'analyse du SDM

Le SDM ne peut pas être évalué à l'aide de cette méthode puisque la vitesse de diffusion des molécules est grandement ralentie près de la limite de diffusion. L'utilisation

de la microscopie à effet tunnel (« confocal microscopy ») permet de suivre la diffusion (entrée ou sortie) de molécules fluorescentes et ainsi de déterminer le SDM de microcapsules de façon individuelle ^{78,79}. Une cellule relâche généralement des protéines couvrant une gamme de poids moléculaires. Une solution de rechange est de mesurer la diffusion de protéines dérivées de cellules encapsulées ⁸⁰. Contrairement aux protéines de petits poids moléculaires, les protéines de gros poids moléculaires seront retardées par la membrane semi-perméable des microcapsules. En comparant la vitesse de sécrétion de petites protéines et de grosses protéines, le SDM peut être estimé. En utilisant des dextrans couvrant une gamme de poids moléculaires, Brissova a établi une technique pour évaluer le SDM d'une large population de microcapsules de grande taille ⁸¹. Il utilise la méthode de chromatographie par exclusion de taille à l'aide d'une colonne remplie de microcapsules. À partir du profil d'élution, cette méthode permet de calculer un coefficient de séparation (K_{sec}) pour chaque dextran. Le K_{sec} est ensuite utilisé pour déterminer le SDM et déduire la dimension des pores des microcapsules.

La diminution de la concentration, du poids moléculaire et du temps d'incubation avec la PLL, de la concentration, du ratio M/G et de la viscosité de l'alginate et l'utilisation de cations ayant moins d'affinités pour l'alginate contribuent à augmenter la perméabilité des microcapsules. En général, une augmentation de la perméabilité des microcapsules provoque une réduction de la résistance à la dégradation mécanique et vice versa. De plus, des modifications mineures aux conditions de fabrications des microcapsules provoquent des variations importantes au niveau de la perméabilité.

A.4.3. Biocompatibilité des îlots microencapsulés

La biocompatibilité se définit comme la capacité d'un biomatériau à exceller dans une application spécifique en induisant une réponse appropriée de l'hôte ³⁹. Cette définition peut être adaptée aux îlots microencapsulés : la microcapsule doit initier une réaction nulle ou minimale de l'hôte (réaction appropriée) puisqu'une réaction cellulaire en périphérie de la membrane semi-perméable interfère avec la diffusion optimale des molécules essentielles pour la survie et la fonction des îlots (application spécifique). L'évaluation de la biocompatibilité des îlots microencapsulés doit être faite en tenant compte de

- 1- l'interaction entre l'hôte et les biomatériaux, 2- l'interaction entre l'hôte et le greffon et 3- l'interaction entre les biomatériaux et le greffon.

A.4.3.1. L'interaction entre l'hôte et les biomatériaux

Communément, la dysfonction des îlots microencapsulés transplantés est toujours associée au développement d'une réaction de l'hôte en périphérie des microcapsules. Celle-ci s'apparente à une réaction à un corps étranger qui se développe contre les matériaux utilisés dans la fabrication des microcapsules puisque des microcapsules vides provoquent la même réaction que des microcapsules renfermant des îlots ^{82,83}. L'interaction entre l'hôte et les biomatériaux est donc un aspect important de l'étude de la biocompatibilité. Pour la plupart des auteurs, une absence de réaction en périphérie des microcapsules est synonyme de biocompatibilité ^{82,84,85}. Toutefois, l'irritation locale des tissus environnants par la procédure d'implantation, la présence des microcapsules (effet mécanique sur les tissus) et/ou la relâche de substances incorporées dans la membrane des microcapsules lors de la fabrication (toxines, antigènes, etc.) peuvent provoquer une réaction inflammatoire des tissus environnants ⁸⁶. Ainsi, les produits de cette inflammation (cytokines, radicaux libres, etc.), qui sont toxiques pour les îlots, pourraient affecter la survie des îlots microencapsulés et ce, même en absence d'une réaction à la surface des microcapsules ⁸⁶.

A.4.3.1.1. Nécessité de purifier l'alginate

L'alginate est un produit brut extrait des algues et renferme des impuretés (protéines, sucres complexes, acides gras, phospholipides, lipopolysaccharides, toxines, polyphénols, etc.) qui peuvent causer l'inflammation ⁸⁷⁻⁹¹. Plusieurs méthodes de purification ont été établies pour éliminer les impuretés ^{87,92-94}. Généralement, ces méthodes renferment des étapes de filtration, d'extraction, de dialyse et de précipitation. Ces méthodes sont associées avec la perte de 25 à 90 % de l'alginate mais selon certains, elles ne semblent pas influencer la composition chimique de l'alginate (bien que la viscosité et le poids moléculaires sont probablement modifiés). Selon la littérature, bien que la réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM) soit substantiellement réduite, ≤ 10 % des microcapsules faites d'alginate purifié provoquent une réaction péricapsulaire ^{54,87,95,96}. Cette observation indique que la biocompatibilité des microcapsules est influencée non

seulement par la pureté des polymères utilisés mais aussi par des imperfections individuelles d'une nature physique.

A.4.3.1.2. Influence des caractéristiques physico-chimiques des microcapsules

La sphéricité et l'intégralité des microcapsules sont des aspects importants, car des microcapsules brisées ou des microcapsules qui présentent des imperfections sont toujours associées au développement d'une réaction envers les corps étrangers^{82,83,95,97-101}. Ces deux aspects sont influencés par la composition chimique de l'alginate. Ainsi, l'utilisation d'une solution d'alginate plus visqueuse améliore la sphéricité en diminuant les déformations visibles alors que l'utilisation d'un alginate riche en G améliore l'intégralité des microcapsules en diminuant le gonflement observé après la fabrication et la transplantation. La composition chimique de l'alginate semble aussi jouer un rôle dans le développement de la réaction péri capsulaire puisque des microcapsules faites d'alginate riche en G provoquent une RHM plus intense que des microcapsules d'alginate riche en M. Cette observation contredit des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* où des alginates de petits poids moléculaires et riches en blocs M stimulent l'activité des leucocytes^{90,102,103}. Toutefois, ces différences s'expliquent par la présence de chaînes de PLL résiduelles à la surface des microcapsules qui est attribuable à une liaison inappropriée avec l'alginate riche en G. En effet, des expériences *in vivo* avec des microcapsules vides ont démontré que l'intensité de la réaction péri capsulaire était proportionnelle avec la quantité de PLL contenue à la surface des microcapsules^{104,105}. La PLL provoquerait une réaction immune par le moyen de sa toxicité intrinsèque et par son pouvoir de stimuler la sécrétion de « tumor necrosis factor- α » (TNF- α)¹⁰⁶. Toutefois, ces effets toxiques peuvent être réduits par l'ajout d'alginate¹⁰⁶, ce qui explique la nécessité de recouvrir complètement et efficacement la PLL par une seconde couche d'alginate. Finalement, la taille des microcapsules est aussi un facteur très important puisque la réduction du diamètre des microcapsules améliore la biocompatibilité¹⁰⁷.

A.4.3.1.3. Modèle *in vivo* pour étudier la biocompatibilité

Afin de déterminer *in vivo* la biocompatibilité des microcapsules, indépendamment de l'immunité liée à la transplantation, il est recommandé d'utiliser un modèle d'isogreff

(des tissus génétiquement identiques transplantés dans le receveur) ¹⁰⁸. De cette façon, le dosage de la masse cellulaire, le site de transplantation et la longévité de la fonction du greffon peuvent être étudiés afin d'optimiser la biocompatibilité inhérente à la microcapsule et ce, sans les variables confondantes reliées à l'immunité d'une allogreffe ou d'une xénogreffe. Après une isogreffe d'îlots microencapsulés, si la fonction est stable, l'étape suivante est d'étudier l'immunoprotection. Si la microcapsule induit une réaction de fibrose, cela veut dire qu'il y a un problème sur le plan de la pureté et/ou du design de la microcapsule. Si une dysfonction des îlots est observée, cela veut dire qu'il y a un problème sur le plan du design de la microcapsule.

A.4.3.2. L'interaction entre l'hôte et le greffon

L'interaction entre l'hôte et le greffon peut se faire via trois mécanismes distincts de rejet : 1- par une reconnaissance directe des antigènes ^{109,110}, 2- par une reconnaissance indirecte des antigènes ^{109,110} et 3- par une réponse inflammatoire non-spécifique ^{109,110}.

A.4.3.2.1. Réaction immunitaire spécifique par reconnaissance directe des antigènes

Dans le premier cas, l'interaction nécessite un contact direct entre les APCs du greffon et les lymphocytes T du receveur ^{109,110}. Le contact est amorcé par la migration des APCs du greffon dans les tissus lymphoïdes du receveur ou lors de la pénétration des lymphocytes T à l'intérieur des îlots. Les APCs du greffon expriment des molécules du CMH de classe II qui présentent des peptides du greffon. Dans le contexte d'une allogreffe, les peptides du greffon qui sont présentés par les CMH ne sont pas considérés comme étrangers ^{109,110}. De plus, les molécules du CMH des APCs du greffon sont assez similaires avec les molécules du CMH de l'hôte pour permettent la liaison avec les récepteurs des lymphocytes T du receveur. Toutefois, les petites différences entre le CMH allogénique et le CMH du soi sont faussement interprétées par les lymphocytes T du receveur comme étant des CMH du soi présentant des peptides étrangers ^{109,110}. Comme beaucoup de lymphocytes T sont impliqués ($CD4^+$ et $CD8^+$), il en résulte une réaction de rejet vigoureuse. Dans le cas d'une xénogreffe, les molécules du CMH du greffon sont tellement différentes des molécules du CMH du soi que les récepteurs des lymphocytes T sont

incapables de les reconnaître. La reconnaissance directe est donc un mécanisme important dans l'allogreffe et moins important dans la xéngreffe ^{109,110}. La membrane semi-perméable des microcapsules empêche la réponse directe sauf si l'encapsulation est inadéquate (îlot qui saillit et n'est pas parfaitement protégé ou « bulging ») ^{97,98}. L'augmentation de la taille des microcapsules et l'utilisation d'un alginate riche en G permettent de réduire le nombre de microcapsules inadéquates.

A.4.3.2.2. Réaction immunitaire spécifique par reconnaissance indirecte des antigènes

Le deuxième mécanisme implique que le greffon relâche des antigènes protéiques qui sont captés, modifiés et présentés sur un CMH de classe II par des APCs du receveur. Celles-ci migrent dans les tissus lymphoïdes du receveur et présentent les peptides du greffon à des lymphocytes T CD4⁺ du receveur ^{109,110}. Une réponse inflammatoire violente (hypersensibilité retardée) et spécifique est par la suite observée. Les îlots de Langerhans possèdent toute la machinerie intracellulaire nécessaire pour la production d'antigènes. Les îlots ^{111,112} et/ou les leucocytes passagers présents à l'intérieur des îlots ¹¹³ relâchent des antigènes qui induisent une réaction indirecte. Bien que l'encapsulation empêche la reconnaissance directe, la membrane semi-perméable des microcapsules ne prévient pas la relâche des antigènes et des protéines qui proviennent des îlots et ne protège qu'en partie contre la réponse inflammatoire spécifique résultant de la reconnaissance indirecte. Ainsi, pour certains auteurs, la réaction péricapsulaire est le résultat final d'une réponse humorale dirigée contre le greffon puisque, dans leurs expériences, des capsules vides ne provoquent aucune réaction ^{84,114,115}. La réponse indirecte va s'intensifier en fonction de la variabilité entre des individus ^{109,110}. Ceci explique les réactions de rejet très intenses observées lors de xéngreffes d'îlots microencapsulés ^{111,116}. Dans le cas d'une allogreffe, les antigènes et les protéines du receveur et du donneur sont presque identiques et la réponse indirecte est donc moins importante. Ainsi, la réaction péricapsulaire et la réaction inflammatoire des tissus environnants augmentent légèrement en intensité lorsque des îlots allogéniques microencapsulés sont transplantés (comparativement à des îlots syngéniques microencapsulés) ¹¹⁷.

A.4.3.2.3. Réaction immunitaire non-spécifique

Le troisième mécanisme survient rapidement après la transplantation et est caractérisé par une réponse inflammatoire non-spécifique ^{109,110}. Dans le cas d'une allogreffe, à la suite du trauma, il y a relâche de chémokines qui attirent des macrophages. Ils relâchent des cytokines (IL-1, TNF- α et IFN- γ), des aldéhydes cytotoxiques, des radicaux oxygénés et de monoxyde d'azote (NO). La membrane semi-perméable des microcapsules pourrait empêcher la diffusion de certaines molécules bien qu'il n'existe pas d'étude exhaustive sur le sujet. Dans le cas d'une xénogreffe, tous les mécanismes de défense de l'immunité innée se déclenchent (activation des neutrophiles, du complément, de la cascade de coagulation, etc.). La présence d'une membrane semi-perméable semble convertir cette vigoureuse réponse inflammatoire non-spécifique en une réponse inflammatoire de type allogreffe. Gray s'interroge sur la pertinence du terme immunoisolation ¹⁰⁹, véhiculé depuis la conceptualisation de l'encapsulation, puisque les microcapsules n'empêchent pas la reconnaissance indirecte et protègent partiellement contre les réponses inflammatoires spécifiques et non-spécifiques. Il propose plutôt l'emploi des termes immunomodulation ou immunoprotection ¹⁰⁹.

A.4.3.2.4. Modèles *in vivo* pour étudier l'efficacité de l'immunoprotection

Après avoir déterminé qu'un système d'encapsulation est biocompatible, il est essentiel de déterminer son niveau de protection contre le système immunitaire. La membrane semi-perméable des microcapsules empêche la reconnaissance directe mais pas la reconnaissance indirecte des antigènes. Le rôle de la reconnaissance indirecte des antigènes semble être moins important dans le cas d'une allogreffe que dans le cas d'une xénogreffe. La première étape de l'évaluation de l'immunoprotection est de réaliser une allogreffe d'îlots ¹⁰⁸. Celle-ci permet de vérifier si le système d'encapsulation protège contre la reconnaissance directe ^{109,110}. Cette étape pourrait aussi permettre de vérifier l'ampleur de la reconnaissance indirecte dans le modèle animal choisi. S'il y a rejet du greffon, cela veut dire qu'il y a probablement des défauts propres au système d'encapsulation utilisé. Par contre, si la méthode est efficace dans la protection contre l'allogreffe, l'étape suivante (la xénogreffe) peut être envisagée ¹⁰⁸. L'importance de procéder à l'évaluation de l'immunoprotection de façon séquentielle est illustrée dans la situation suivante : par exemple, le rejet d'une xénogreffe mais pas d'une allogreffe

confirme que le rejet n'est pas causé par un manque de biocompatibilité ou par une défectuosité du système d'encapsulation, mais est causé par une réaction immune contre la xénogreffe. Lors d'une xénogreffe, l'utilisation de modèles transgéniques (modèles CMH-déficients, cellules-déficientes, complément-déficient, etc.) permet de déterminer quelle thérapie accessoire pourrait être utilisée afin d'obtenir une fonction stable du greffon ¹⁰⁸.

A.4.3.3. L'interaction entre les biomatériaux et le greffon

Cet aspect a toujours été négligé face aux deux aspects précédents. Les biomatériaux utilisés, la procédure d'encapsulation et la microcapsule elle-même ne doivent pas altérer la viabilité et la fonction des îlots.

A.4.3.3.1. Effet des caractéristiques chimiques des biomatériaux

Certaines contaminations de l'alginate peuvent être cytotoxiques pour les îlots ^{88,92}. En utilisant certaines méthodes de purification de l'alginate, nous avons démontré une amélioration de la viabilité et de la fonction (sécrétion d'insuline) des îlots microencapsulés (données personnelles). Les propriétés de l'alginate permettent la fabrication de microcapsules dans des conditions physiologiques. Des étapes de fabrication de la procédure originale d'encapsulation, en plus de réduire la stabilité des microcapsules, entravaient la fonction des îlots (gélification à l'aide chlorure de calcium, liquéfaction du cœur de la microcapsule à l'aide du citrate, lavages fréquents et prolongés dans la saline, etc.) et ont été modifiées ou éliminées (gélification à l'aide du lactate de calcium, lavages réduits dans la saline, élimination de l'étape de liquéfaction, etc.) ^{39,69,118}. De plus, en utilisant plusieurs lignées cellulaires, Strand a démontré que la PLL avait le pouvoir de causer la nécrose et de stimuler la production de TNF- α ¹⁰⁶. Bien que la toxicité de la PLL peut être réduite par l'ajout d'alginate, il a aussi observé, une diminution importante de la viabilité des cellules encapsulées se retrouvant en bordure de la membrane semi-perméable composée de PLL et d'alginate ¹⁰⁶. Cet effet est aussi observé avec des îlots (données personnelles).

A.4.3.3.2. Influence de la microcapsule elle-même

D'un point de vue transport de masse, la réduction du diamètre des microcapsules est très avantageuse et améliore la diffusion de l'oxygène, du glucose, de l'insuline et des nutriments. Toutefois, même en utilisant de l'alginate purifié et une procédure de fabrication physiologique, la microcapsule elle-même interfère directement dans la fonction et la viabilité des îlots. En effet, à la suite de l'encapsulation, des îlots ont une légère suppression de la sécrétion d'insuline qui peut être renversée après une période de culture *in vitro* ¹¹⁹⁻¹²¹. Des études de périfusion ont démontré que l'encapsulation provoquait une baisse de la quantité absolue d'insuline sécrétée bien que la réponse à de fortes concentrations de glucose soit aussi rapide pour les îlots non encapsulés que pour les îlots microencapsulés ^{118,122}. De Vos a démontré que, même en absence d'une réaction cellulaire péricapsulaire, des îlots microencapsulés finissent par mourir par un mécanisme de nécrose ⁸⁹. Ceci s'explique par une nutrition déficiente due au fait que la membrane semi-perméable des microcapsules empêche la revascularisation des îlots transplantés.

A.4.3.4. Conséquences de la réponse biologique contre les îlots microencapsulés

La dysfonction du greffon est généralement associée au développement d'une réponse biologique péricapsulaire ^{100,103,123}. Plusieurs chercheurs ont observé une corrélation inverse entre l'intensité de la RHM et la survie des îlots microencapsulés ^{97,98,114,115,117,118,123-125}. De Vos a observé un seuil au-dessus duquel la réponse inflammatoire est directement liée à la dysfonction de la greffe (si >10 % des microcapsules implantées provoquent une réaction, la survie de tous les îlots microencapsulés transplantés est compromise) ⁹⁸.

A.4.3.4.1. Rôle du complément

Le système du complément joue un rôle important dans l'immunité naturelle (système de destruction rapide des microorganismes). Il est constitué d'une douzaine de protéines qui interagissent entre elles via trois mécanismes enzymatiques d'activation (la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines) et un mécanisme non enzymatique de cytolyse (voie d'attaque membranaire) ¹²⁶. Des expériences *in vitro* ont démontré que les microcapsules protégeaient les îlots d'une exposition directe aux molécules du complément

et de la cytolyse ^{29,127-129}. Cependant les microcapsules peuvent activer le système du complément ¹²⁸. Un des résultats de l'activation du système du complément est la génération d'anaphylatoxines (fragments C3a et C5a) qui peuvent recruter (propriétés chimiotactiques) des phagocytes en périphérie des microcapsules, stimuler la flambée respiratoire (« oxydative burst ») et déclencher la libération de médiateurs de l'inflammation ¹²⁶. De plus, des expériences *in vitro* ont démontré que des microcapsules exposées au système du complément sont recouvertes de composés C3 tronqués (C3b). Ceci pourrait favoriser l'adhésion des macrophages à la surface des microcapsules (données non-publiées).

A.4.3.4.2. Rôle des cellules

Généralement, à la suite de l'implantation d'un biomatériau, il y aura adsorption de protéines à la surface (réduite si le biomatériau est un hydrogel) comme le fibrinogène et le C3b qui favoriseront l'adhésion des macrophages ¹³⁰⁻¹³³. Ceux-ci produisent des médiateurs qui stimulent l'inflammation ^{134,135} ainsi que le recrutement et l'activation de macrophages et fibroblastes. Plusieurs études démontrent que le macrophage est le type cellulaire le plus important en nombre à la suite de l'implantation de microcapsules dans le péritoine ^{136,137}, dans les coussins graisseux épидидymaires ¹³⁸ et à la périphérie des microcapsules ^{62,137,139}. Une RHM peut se développer à la suite de l'implantation de microcapsules dans des souris et des rats *nu/nu* (sans lymphocyte T) ce qui confirme l'importance des macrophages et le rôle non essentiel des lymphocytes T ^{105,120,122,140}. De plus, des macrophages activés peuvent stimuler le système fibrinolytique plasminogène-plasmine qui accélère la dégradation des microcapsules ¹⁴¹. Les neutrophiles et les lymphocytes sont aussi activés à la suite de l'implantation de microcapsules ^{39,136,138,142}. Ils contribueraient à l'élévation de la concentration locale des médiateurs de l'inflammation. Des lymphocytes Th ont été identifiés parmi les cellules impliquées dans la RHM ^{84,102,114,115}. La RHM serait dépendante des lymphocytes Th et son développement se ferait selon la voie Th1-dépendante ¹¹⁴. D'autres cellules, généralement observées dans les réactions à corps étranger, ont été identifiées à la suite de l'implantation et dans l'infiltration cellulaire en périphérie des microcapsules (fibroblastes, fibrocytes, cellules géantes, granulocytes, etc.) ^{83,138,142}.

A.4.3.4.2.1. Barrière physico-métabolique à la diffusion

Les échanges essentiels à la survie et à la fonction des îlots se font par diffusion passive à travers la membrane des microcapsules, car le greffon n'est pas revascularisé après la transplantation. Les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire, qui s'accumulent en périphérie des microcapsules, forment un tout qui est métaboliquement actif ^{104,105,143}. Une hypothèse pour expliquer la mort du greffon veut que cette infiltration cellulaire péri capsulaire agisse comme une barrière physique et une barrière métabolique qui empêchent la libre diffusion des molécules essentielles à la survie des îlots ^{82,88,92,103,105,118,125}.

A.4.3.4.3. Rôle des médiateurs cellulaires

Les cellules activées peuvent sécréter des médiateurs dont le rôle est de recruter et d'activer d'autres leucocytes et causer des dommages directs à l'îlot. Certains des médiateurs sont des cytokines proinflammatoires [IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β et IFN- γ , « monocyte chemotactic protein-1 » (MCP-1), « growth-regulated oncogene » (GRO), « macrophage inflammatory protein-1 » (MIP-1) et « regulated on activation, normal T cell expressed and secreted » (RANTES)] qui sont des facteurs chimiotactiques qui attirent des leucocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales ^{134,135}. Ces cytokines peuvent aussi induire la production de médiateurs additionnels. Des études démontrent que le TNF- α et l'IL-1 β sont produits par les macrophages en contact avec des biomatériaux. De plus, ils sont impliqués dans la pathogenèse du diabète de type 1, inhibent la fonction des îlots et semblent participer au rejet d'allogreffes. L'induction de « inducible nitric oxyde synthase » (iNOS) et subséquemment la production de NO sont un exemple de l'effet du TNF- α et de l'IL-1 β sur les cellules β des îlots. Les cytokines proinflammatoires peuvent aussi amorcer une cascade d'événements menant à la fibrose. Les cytokines fibrogéniques [TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , « transforming growth factor- β_1 » (TGF- β_1), « platelet-derived growth factor-aa » (PDGF-aa), « fibroblast growth factor 1 & 2 » (FGF1 et 2)] agissent directement ou indirectement sur la prolifération des fibroblastes et sur la stimulation de la production des protéines de la matrice extracellulaire ^{134,135,144,145}. Le TGF- β_1 induit directement la prolifération des fibroblastes et est le plus puissant stimulateur de l'expression des gènes du

collagène et de la fibronectine ^{134,135,144-146}. De plus, des leucocytes activés peuvent sécréter des aldéhydes, des radicaux oxygénés et du NO qui peuvent être cytotoxiques pour l'îlot. Par exemple, le NO inhibe l'activité de l'enzyme mitochondriale aconitase et induit des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) ¹⁰⁵.

A.4.3.4.3.1. Immunoprotection inadéquate contre certains médiateurs cellulaires

In vitro, les microcapsules d'alginate-PLL activent des macrophages qui sécrètent les cytokines IL-1 β , TNF- α et IL-6 ^{90,103,147}. Ainsi, la réponse biologique contre les îlots microencapsulés peut causer la dysfonction du greffon via une action directe des cytokines et du NO relâchés par des macrophages et des leucocytes activés ^{82,90,103,125,147}. Plusieurs études démontrent que le NO ¹²⁵ et certaines cytokines comme le TNF- α ¹¹⁹, le TNF- β ¹¹⁵, l'IL-6 ¹⁴⁸ et l'IL-1 β ^{82,115,119,125} pénétreraient à l'intérieur des microcapsules pour interférer avec la fonction des îlots et causer la mort du greffon. Pourtant, certaines études *in vitro* démontrent que les microcapsules protègent les îlots contre les dommages oxydants causés par le TNF- α ^{148,149}, l'IL-1 β ¹⁴⁹ et l'IFN- γ ¹⁴⁹. Ces contradictions peuvent s'expliquer par une différence dans la perméabilité des microcapsules et par la charge nette à la surface des microcapsules qui pourrait repousser des molécules dont la taille est plus petite que les pores de la membrane semi-perméable ¹⁴⁹.

A.5. Problématique de la masse cellulaire transplantée

Bien que la faisabilité de la transplantation d'îlots microencapsulés a été démontrée à l'aide de plusieurs modèles animaux et même chez un patient diabétique, un obstacle majeur limite l'application clinique à grande échelle. En effet, la survie du greffon est toujours limitée à plusieurs mois et n'est jamais indéfinie ^{50,54,87,98}. Ces échecs ne peuvent pas être expliqués par une RHM, puisque l'introduction de matériaux biocompatibles fait en sorte que < 10 % des microcapsules transplantées présentent une réaction péricapsulaire ^{87,89}. À première vue, même les mécanismes de rejets ne peuvent pas expliquer ces échecs puisque des taux de survie comparables ont été observés dans le cas d'allogreffes et d'isogreffes ⁸⁷.

A.5.1. Diminution de la masse d'îlots transplantés

La survie limitée du greffon est associée à une diminution de la masse d'îlots microencapsulés transplantés. En effet, 4 semaines après la transplantation, De Vos a observé une diminution de 40 % de la masse d'îlots microencapsulés ⁸⁹. Cette diminution a été observée malgré un taux de réplication des cellules des îlots microencapsulés 10 fois plus élevé que dans le pancréas ⁸⁹. La progression importante de la nécrose est responsable de ce processus d'involution des îlots microencapsulés. De plus, la nécrose atteint principalement les cellules β ⁸⁹.

A.5.1.1. Diffusion réduite des nutriments

L'observation que la nécrose est principalement située au centre des îlots microencapsulés suggère qu'une nutrition déficiente est une des causes majeures de la mort du greffon. La nutrition déficiente des îlots microencapsulés serait la conséquence du fait qu'ils restent libres. En effet, après la transplantation dans le péritoine, les îlots microencapsulés ne sont pas revascularisés. L'apport en nutriments dépend donc de la diffusion passive en provenance du sang vers le péritoine. La membrane semi-perméable de la microcapsule représente un obstacle supplémentaire qui ralentit ce processus de diffusion. En plus du processus de diffusion passive très lent ¹⁵⁰, le péritoine est un site où la concentration d'oxygène ^{99,151,152} et de minéraux essentiels ^{153,154} est très faible. Tous ces facteurs interfèrent avec la nutrition des îlots microencapsulés. La réduction de la taille des microcapsules (diamètre < 350 μm) ⁶⁵ améliore le ratio surface/volume ce qui favorise un processus de diffusion plus rapide. De plus, la réduction de la taille des microcapsules permet l'accès à des sites de transplantation plus vascularisés comme le foie ¹⁵⁵ et la rate (sites inaccessibles pour des microcapsules de $\geq 400 \mu\text{m}$).

A.5.1.2. Importance du support trophique fourni par le pancréas

Il existe une corrélation entre la détérioration progressive de la fonction des îlots non encapsulés transplantés et la perte de la masse de cellules β . Cette corrélation a été observée après la transplantation dans des sites vascularisés ^{156,157}. Les méthodes actuelles d'isolement et de purification des îlots présupposent que ceux-ci peuvent survivre indépendamment des autres éléments du pancréas et résister aux conditions excessives

utilisées pour les extraire de leur milieu naturel. Paraskevas a démontré l'induction de l'apoptose à la suite de l'isolement et la culture des îlots dans des conditions standard ¹⁵⁸. De plus, ce phénomène est sélectif puisque ce sont les cellules β qui sont les plus vulnérables ¹⁵⁹. Donc, la masse d'îlots nécessaire pour la transplantation est qualitativement et quantitativement diminuée.

A.5.1.2.1. Mécanismes biochimiques

Au niveau biochimique, le devenir d'une cellule semble être déterminé en partie par l'équilibre qui existe entre les « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs) ¹⁶⁰. Par exemple, une activation des sérines-thréonines kinases « c-jun N-terminal kinase » (JNK) et « 38 kDa protein » (p38), par un stress extracellulaire (élément cytotoxique ou perte du support trophique), provoque l'induction de l'apoptose ^{161,162}. Par opposition, l'activation des sérines-thréonines kinases « extracellular regulated kinases 1 & 2 » (ERK 1 et 2) induit une cascade de signalisation antiapoptotique ^{163,164}. Rosenberg et Paraskevas ont démontré que l'isolement des îlots provoque un stress extracellulaire qui induit une augmentation de l'expression et de la phosphorylation des kinases JNK et p38 au détriment des kinases ERK 1 et 2 ^{165,166}. Ce déséquilibre en faveur de la voie de signalisation proapoptotique explique l'augmentation des niveaux d'apoptose dans les îlots fraîchement isolés.

A.5.1.2.2. Rôle du microenvironnement pancréatique

A.5.1.2.2.1. Matrice extracellulaire

Une des composantes du microenvironnement pancréatique est la membrane périinsulaire (« basement membrane ») qui fait partie de la matrice extracellulaire. Une perturbation de la matrice extracellulaire et la perte de la membrane périinsulaire provoquent une induction de l'apoptose et des preuves récentes suggèrent un rôle des intégrines ¹⁶⁷. Les intégrines sont des récepteurs par lesquels les cellules interagissent avec la matrice extracellulaire. Ces récepteurs transduisent des stimulus extracellulaires en une variété de réponses intracellulaires incluant la survie. Rosenberg et Wang ont démontré que l'apoptose des îlots, associée à la procédure d'isolement, est la résultante de la disparition

de la membrane périinsulaire ^{166,168} et de la diminution de l'expression des intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$ et αV ^{166,168}.

A.5.1.2.2.2. Cellules épithéliales canaliculaires pancréatiques

Au même titre que les interactions cellule-matrice extracellulaire, les interactions cellule-cellule sont importantes sur le plan du développement et de la différenciation cellulaire dans le pancréas. Par exemple, très tôt durant la morphogenèse pancréatique, une connexion s'établit entre les cellules épithéliales canaliculaires pancréatiques (« duct epithelial cells ») et les îlots ¹⁶⁹. En effet, dans le mésenchyme, les cellules endocrines se développent à partir de structures canaliculaires pour former des îlots primitifs qui sont adjacents aux canaux ¹⁶⁹. Cette interrelation est conservée chez l'adulte puisque la néogenèse des îlots se fait via les cellules canaliculaires ^{170,171}. Les cellules canaliculaires semblent sécréter un facteur qui induit la prolifération cellulaire chez des îlots matures ¹⁷². Récemment, Ilieva a démontré que les cellules épithéliales canaliculaires favorisent la survie des îlots ¹⁷³. En effet, l'isolement, la purification et la culture des îlots provoquent une augmentation de la mort cellulaire par des processus de nécrose et d'apoptose ¹⁷³. Ces deux processus de mort cellulaire peuvent être diminués par une incubation avec des cellules canaliculaires ou avec du milieu conditionné par les sécrétions des cellules canaliculaires ¹⁷³.

A.5.1.2.3. IGF-II est un facteur de survie

D'une façon paracrine, les facteurs de croissance stimulent un large éventail de réponses cellulaires qui incluent la synthèse de la matrice extracellulaire, la prolifération et la différenciation cellulaire ¹⁷⁴. De plus, dans presque toutes les situations où l'apoptose est induite, les facteurs de croissance peuvent avoir un effet antiapoptotique ¹⁷⁵. Donc, la régulation des niveaux d'expression des facteurs de croissance est importante autant pour contrôler la prolifération cellulaire, que pour maintenir la viabilité de cellules susceptibles à l'apoptose. Bien qu'un rôle pour les « insulin-like growth factors » (IGFs) ait été proposé ¹⁷⁶, le rôle des facteurs de croissance sur la survie des îlots dans le pancréas est relativement peu connu. Les IGFs inhibent l'apoptose de plusieurs types cellulaires ¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. Une diminution de l'expression d'IGF-II dans les cellules des îlots est associée au

phénomène normal d'apoptose qui survient lors du développement des îlots néonataux ¹⁸¹. De plus, à l'aide d'un modèle transgénique où il y a surexpression d'IGF-II, Hill a démontré que des niveaux sanguins élevés et persistants d'IGF-II pouvaient supprimer le phénomène d'apoptose dans les cellules des îlots néonataux ¹⁸². De façon encore plus pertinente, Ilieva a démontré que l'effet bénéfique des cellules canaliculaires sur la survie des îlots fraîchement isolés semble se faire via la sécrétion paracrine d'IGF-II ¹⁷³. En effet, les cellules canaliculaires sécrètent principalement de l'IGF-II ¹⁷³. Lors de la période de culture des îlots, l'ajout d'IGF-II permet de diminuer de façon significative les niveaux de nécrose et d'apoptose ¹⁷³.

A.5.1.2.3.1. IGF-II est un membre du système IGF

L'IGF-II fait partie du système IGF qui comprend l'IGF-I, l'insuline et 3 récepteurs : le récepteur à l'insuline (R-Ins), le récepteur à IGF-I ou de type I (R-I) et le récepteur à IGF-II ou de type II (R-II) ¹⁸³⁻¹⁸⁵. De plus, six protéines de liaisons (IGFBP-1 à -6), des protéases qui dégradent les IGFBPs, des variants d'IGF-I et -II, des variants de récepteurs, des récepteurs hybrides R-Ins/R-I, des récepteurs putatifs pour les IGFBPs et de nouvelles protéines apparentées à la famille des IGFBPs (les IGFBP-rP) viennent s'ajouter et complexifier ce système ^{183,186-188}. L'IGF-II est une protéine de 70 acides aminés (présentant un degré important d'identité avec la proinsuline) dont le gène est sur le bras court du chromosome 11 (bande p15.5) ¹⁸³. Bien que plusieurs tissus expriment l'ARNm des IGFs et que tous les organes sous le contrôle de l'hormone de croissance synthétisent les IGFs, le foie est le site principal de synthèse des IGFs ¹⁸³. Au niveau pancréatique, en plus des cellules canaliculaires qui sécrètent de l'IGF-II ¹⁷³, les îlots de Langerhans, principalement les cellules β , synthétisent des IGFs ^{189,190}. Chez l'humain, l'IGF-II est plus abondant que l'IGF-I durant la vie foetale alors que l'inverse est observé après la naissance (bien que diminuée, l'expression d'IGF-II demeure) ¹⁹¹. Cette expression quasi universelle illustre bien la fonction autocrine, la fonction paracrine et la fonction endocrine des IGFs. Les IGFBPs sont présentes dans la circulation, les liquides biologiques et les espaces intercellulaires. Elles exercent 4 actions majeures sur les IGFs : **1-** les transporter dans le sang et les tissus ^{183,186-188}; **2-** prolonger leur demi-vie et contrôler leur élimination ^{183,186-188}; **3-** permettre une localisation spécifique selon les tissus et les cellules ^{183,186-188}; **4-** moduler les interactions des IGFs avec leurs récepteurs ^{183,186-188}. Les R-Ins (affinité non négligeable

pour IGF-II) et les R-I (très haute affinité pour IGF-II) sont des hétérotétramères ¹⁸³⁻¹⁸⁵. Ils sont formés de deux chaînes α extracellulaires qui lient le facteur et de deux chaînes β transmembranaires. Celles-ci renferment un domaine tyrosine kinase cytoplasmique qui est activé par la liaison du ligand. Le R-II (très haute affinité pour IGF-II) est un monomère transmembranaire ¹⁸³⁻¹⁸⁵. Il est aussi le récepteur du mannose-6-phosphate, responsable de la localisation des protéines dans les lysosomes.

A.5.1.2.3.2. Voies de signalisation des récepteurs de l'IGF-II

Les effets biologiques (métaboliques, mitogènes, différenciation, antiapoptotiques, etc.) de l'IGF-II sont transmis par les R-Ins et R-I ^{183,184,192}. Le R-II ne semble pas transmettre de signal et son rôle pourrait être d'enlever l'excès d'IGF-II du milieu en l'internalisant et le dirigeant vers les lysosomes ^{183,184,192}. Bien qu'il existe de multiples voies potentielles de signalisations et d'interrelations, l'activation des récepteurs de l'IGF-II (R-Ins et R-I) induit principalement deux grandes voies de signalisation intracellulaire : 1- la voie de la phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) ^{183,192,193} et 2- la voie des MAPKs ^{183,192,193}. L'activation du récepteur provoque son autophosphorylation qui permet le recrutement des protéines adaptatrices « insulin receptor substrats » (IRS 1 à 4). Les IRSs recrutent et activent la PI3K. Celle-ci phosphoryle la position 3' des phosphoinositides de la membranes plasmique, ce qui active les sérines-thréonines kinases PDKs (« phosphatidylinositol-dependent kinases 1 & 2 »). Les PDKs ont pour substrat la sérine-thréonine kinase PKB/Akt (protéine kinase B/Akt). PKB/Akt phosphoryle de nombreux substrats, provoquant soit leur activation, soit leur inactivation et induit les divers effets biologiques (dont les effets antiapoptotiques et mitogènes) de l'IGF-II ^{183,192-195}. L'autophosphorylation du récepteur permet aussi le recrutement de la protéine adaptatrice SHC. Celle-ci recrute le complexe Grb2-SOS qui active Ras, une petite protéine G attachée à la face interne de la membrane plasmique par un groupement farnésyl. La protéine Ras active les protéines Raf (Raf-1 et B-Raf) qui phosphorylent et activent la protéine kinase MEK (« MAP/ERK kinase »). MEK a pour substrats les protéines kinases ERKs de la grande famille des MAPKs. La stimulation des ERKs est responsable des effets mitogènes et antiapoptotiques de l'IGF-II ^{183,192-195}. La figure 2 illustre les voies de signalisation probables pour expliquer l'effet antiapoptotique alors que la figure 3 illustre les voies de signalisation probables pour expliquer les effets mitogènes de l'IGF-II. Ces deux effets sont

nécessaires pour réduire la mort cellulaire (qui survient par nécrose et par apoptose) des îlots fraîchement isolés et maintenus en culture.

Figure 2 : Schématisation des voies de signalisation intracellulaire responsables des effets antiapoptotiques de l'IGF-II (page suivante).

Trois voies antiapoptotiques peuvent être activées suite à la liaison de l'IGF-II avec ses récepteurs : la voie de la PI3K qui mène à l'activation de la kinase Akt/PKB, la voie des ERKs qui mène à l'activation de la kinase p90/rsk et la voie de la protéine P14-3-3 qui mène à l'activation de Raf. Le résultat principal de l'activation de ces trois voies est la phosphorylation et l'inactivation du facteur proapoptotique BAD. Du point de vue de la mitochondrie, BAD-phosphorilé se retrouve séquestré par la P14-3-3. Il ne peut donc plus séquestrer les facteurs antiapoptotiques Bcl-xl et Bcl-2 et former des homodimères qui permettent la relâche du cytochrome C. Ces trois voies de signalisation sont reliées à plusieurs niveaux et pourraient avoir d'autres effets antiapoptotiques. Par exemple, la kinase Akt/PKB peut inhiber la caspase 9, activer le facteur de transcription NF- κ B qui permet l'expression de gènes antiapoptotiques et inhiber l'activation du facteur de transcription « forkhead » qui permet la transcription de gènes proapoptotiques. Les ERKs, via la kinase p90/rsk, peuvent activer le facteur de transcription CREB qui permet la transcription de Bcl-2. La kinase Raf peut inhiber la formation du complexe apoptosome en inhibant la caspase 9. Bien que la présence des récepteurs, la présence de la plupart des médiateurs et l'implication de certaines voies aient été démontrés chez les îlots, l'implication des voies antiapoptotiques, telles que décrites dans cette figure, reste à être démontrée.

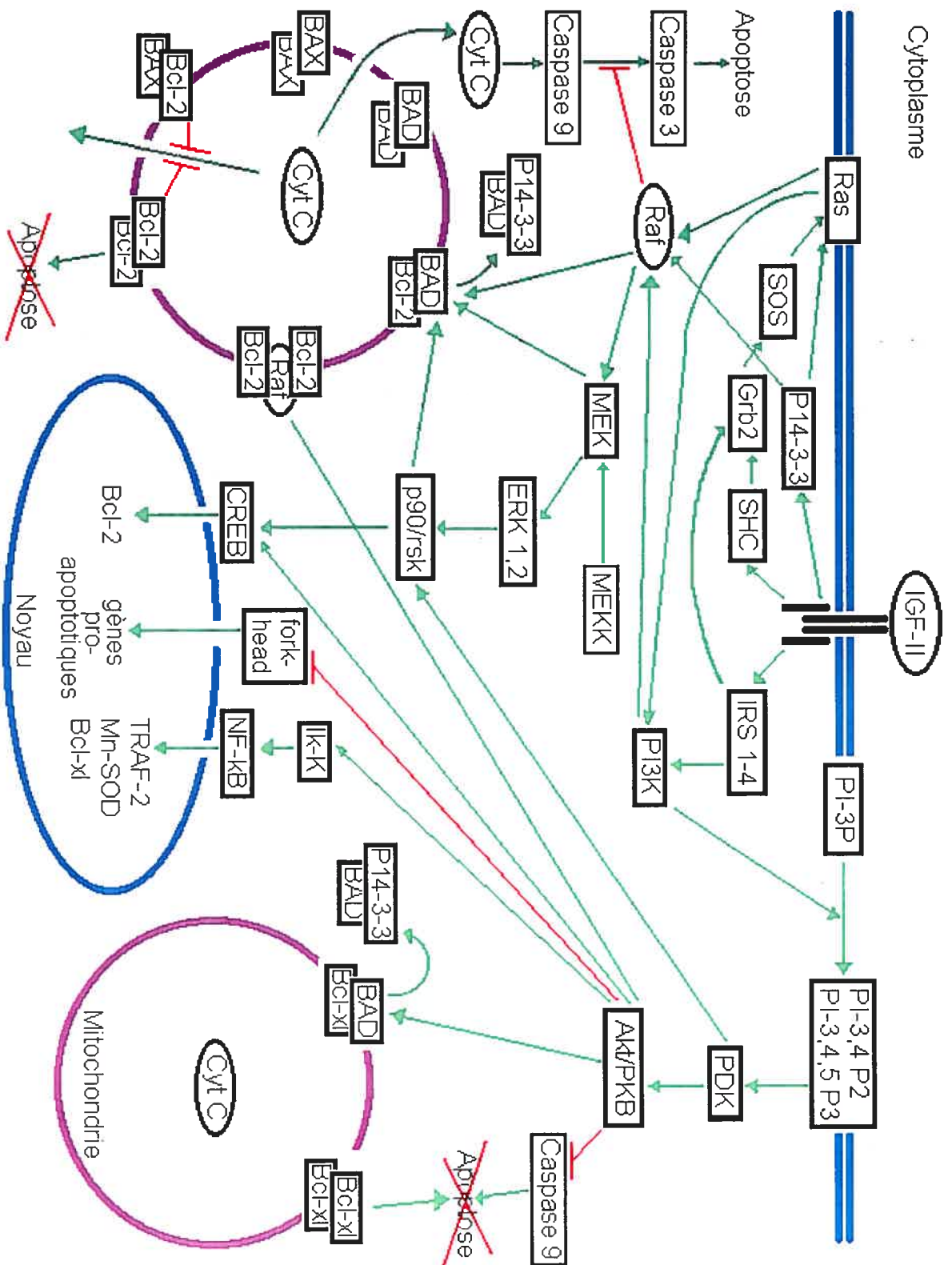
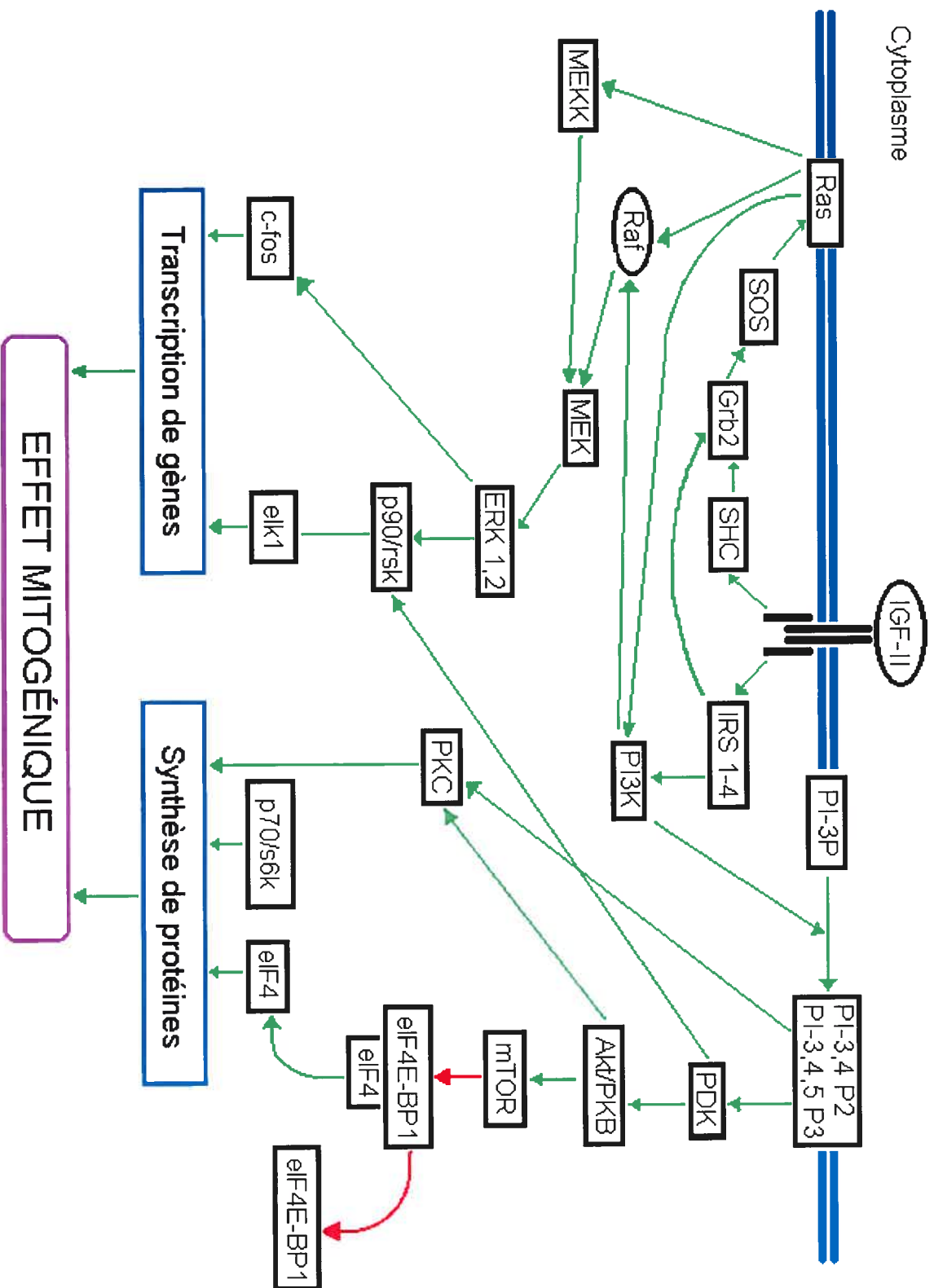


Figure 3 : Schématisation des voies de signalisation intracellulaire responsables des effets mitogènes de l'IGF-II (page suivante).

Deux voies mitogéniques peuvent être activées à la suite de la liaison de l'IGF-II avec ses récepteurs : la voie de la PI3K qui mène à l'activation de la kinase Akt/PKB et la voie des ERKs. La kinase Akt/PKB initie une série de cascades d'activation qui mènent à l'augmentation de la synthèse protéique. Par exemple, Akt/PKB peut phosphoryler et activer la kinase mTOR. mTOR active la kinase p70/s6k et phosphoryle le facteur inhibiteur eIF4E-BP1. eIF4E-BP1 phosphorylé libère le facteur d'initiation de la traduction eIF4. Les ERKs peuvent initier des cascades d'activation qui mènent à l'augmentation de la transcription de gène. Par exemple, les ERKs, directement ou via la kinase p90/rsk, peuvent activer des facteurs de transcription comme c-fos et elk1.

Cytoplasme



B. HYPOTHÈSES

Le travail de recherche a été amorcé afin de vérifier les hypothèses suivantes :
1- des interventions ciblées dans le temps, au niveau moléculaire et/ou cellulaire, pourraient permettre de réduire la réaction de l'hôte contre les microcapsules; 2- la modulation du SDM de la membrane semi-perméable pourrait avoir un effet sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés; 3- la culture des îlots microencapsulés dans un milieu conditionné par l'IGF-II, durant la période précédant la transplantation, pourrait permettre de maintenir ou d'améliorer la masse cellulaire fonctionnelle.

B.1. Raisonnement

B.1.1. Hypothèse 1 (Objectifs 1 et 2)

Encore de nos jours, la biocompatibilité est une propriété des microcapsules qui n'est pas parfaitement maîtrisée. En effet, la biocompatibilité insuffisante des microcapsules provoque l'échec des transplantations. La plupart des études qui portent sur la biocompatibilité des microcapsules sont focalisées sur l'évaluation de la réaction péri capsulaire et non sur la cinétique des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réaction de l'hôte contre les microcapsules. Une connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires et de leur évolution dans le temps est essentielle pour le développement de nouveaux biomatériaux ou de stratégies visant à améliorer la biocompatibilité.

B.1.2. Hypothèse 2 (Objectifs 3 et 4)

La survie et la fonction des îlots microencapsulés dépendent de la libre diffusion des nutriments essentiels et de l'immunoprotection. De très petites modifications sur le plan de la fabrication des microcapsules se traduisent par d'importantes modulations de la perméabilité et du SDM. Bien qu'il existe des méthodes afin de caractériser la perméabilité et le SDM des microcapsules de taille standard, la plupart des méthodes présentent des limitations. De plus, aucune méthode n'a été validée pour caractériser les propriétés de très

petites microcapsules ($< 350 \mu\text{m}$). Étonnamment, une question fondamentale est, encore de nos jours, sans réponse : qu'elle est l'importance du SDM sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés? On peut supposer que l'immunoprotection nécessite le plus petit SDM, alors que la diffusion des éléments essentiels à la survie et la fonction des îlots nécessite le plus grand.

B.1.3. Hypothèse 3 (Objectif 5)

Un autre problème majeur, qui limite l'application clinique de la transplantation d'îlots microencapsulés, est que la survie limitée du greffon est associée à une diminution de la masse d'îlots microencapsulés transplantés. Cette diminution est attribuable principalement à la mort des cellules β . Celle-ci s'explique en partie par la perte, lors de l'isolement et de la culture des îlots, du support trophique fourni par le pancréas. Certaines observations, faites lors d'expériences *in vitro*, suggèrent que la restauration d'une partie du support trophique (coincubation de cellules épithéliales pancréatiques ou coincubation avec leurs produits de sécrétion dont l'IGF-II) permet de maintenir ou d'améliorer la qualité de la masse cellulaire. Cependant, aucune étude n'a démontré si cet effet pouvait être reproduit avec des îlots microencapsulés. De plus, une question primordiale demeure : est-ce que l'amélioration de la qualité de la masse cellulaire *in vitro*, par exemple par l'ajout d'IGF-II, se traduit par une amélioration de la fonction des îlots microencapsulés *in vivo*?

C. OBJECTIFS

C.1. Objectif 1

Le but de l'étude 1 (Chapitre D. 1) était de déterminer le rôle du TGF- β_1 dans la pathogenèse et le maintien de la réaction de l'hôte contre les microcapsules d'alginate poly-L-lysine. L'objectif spécifique était de déterminer la cinétique d'expression du TGF- β_1 par RT-PCR semi-quantitative en réponse à l'implantation de microcapsules dans les coussins graisseux épидидymaires (site qui permet d'étudier la biocompatibilité à long terme).

C.2. Objectif 2

Le but de l'étude 2 (Chapitre D.2) était de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la phase précoce de la réaction de l'hôte contre les microcapsules. Les objectifs spécifiques étaient de : 1- déterminer la cinétique de la réaction cellulaire en réponse à l'implantation de microcapsules d'alginate poly-L-lysine dans la cavité péritonéale (site de transplantation habituel); 2- identifier les types cellulaires impliqués; 3- déterminer la cinétique d'expression par RT-PCR semi-quantitative des cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) et de la cytokine fibrogénique TGF- β_1 .

C.3. Objectif 3

Le but de l'étude 3 (Chapitre D.3) était de déterminer la perméabilité de très petites microcapsules d'alginate poly-L-lysine (< 350 μm), faites à l'aide du générateur d'impulsion électrostatique, en évaluant la diffusion d'une grande variété de molécules (dextrans et protéines). Les objectifs spécifiques étaient de : 1- valider l'utilisation de la méthode de chromatographie par exclusion de taille pour déterminer la diffusion de dextrans et de protéines, 2- déterminer le SDM des microcapsules faites dans notre laboratoire; 3- démontrer la capacité de cette méthode à discerner l'absorption de l'adsorption d'une molécule (limitation de presque toutes les autres techniques d'évaluation du SDM); 4- déterminer si l'insuline diffuse librement à travers la membrane semi-

perméable des microcapsules; 5- identifier les paramètres qui permettent de moduler le SDM des microcapsules.

C.4. Objectif 4

Le but de l'étude 4 (Chapitre D.4) était de déterminer l'effet du SDM sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés. Les objectifs spécifiques étaient de : 1- créer des microcapsules ayant des SDMs différents (petit = protéines 15-30 kDa, moyen = protéines 40-60 kDa, grand = protéines 85-100 kDa) et qui possèdent une résistance adéquate à la dégradation mécanique; 2- étudier *in vitro* l'effet du SDM sur la survie des îlots microencapsulés; 3- étudier *in vivo* l'effet du SDM sur la fonction des îlots microencapsulés.

C.5. Objectif 5

Le but de l'étude 5 (Chapitre D.5) était de déterminer l'effet de la restauration partielle du support trophique pancréatique sur la viabilité et la fonction des îlots microencapsulés. Les objectifs spécifiques étaient de : 1- déterminer les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire des îlots microencapsulés; 2- évaluer l'effet de la culture dans un milieu conditionné par l'IGF-II sur la survie *in vitro* des îlots microencapsulés; 3- évaluer l'effet de la culture *ex-vivo* dans un milieu conditionné par l'IGF-II sur la fonction *in vivo* des îlots microencapsulés transplantés.

D. ÉTUDES

D.1. Étude 1. Time course of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) mRNA expression in the host reaction to alginate-poly-L-lysine microcapsules following implantations into rat epididymal fat pads

Robert Robitaille, Karine Desbiens, Nathalie Henley et Jean-Pierre Hallé

J Biomed Mater Res, 2000. **52**(1): p. 18-23.

Rôle des coauteurs :

Karine Desbiens et Nathalie Henley ont participé à l'analyse des résultats ainsi qu'à la révision de l'article. Jean-Pierre Hallé a participé à la conception du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'ai fait une contribution majeure en participant activement à la conception du projet, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'étais le premier responsable des travaux et des résultats de recherche donnant lieu à cet article.

TIME COURSE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β_1 (TGF- β_1) mRNA
EXPRESSION IN THE HOST REACTION TO ALGINATE-POLY-L-LYSINE
MICROCAPSULES FOLLOWING IMPLANTATIONS INTO RAT EPIDIDYMAL FAT
PADS

Robert Robitaille, Karine Desbiens, Nathalie Henley, Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec,
H1T 2M4, Canada

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

Running Title: TGF- β_1 mRNA expression.

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Canada

Fax: (514) 252-3430



ABSTRACT

Microencapsulation of islets of Langerhans within semipermeable membranes has been proposed to prevent their immune destruction after transplantation. However, the successful application of this method is impaired by a pericapsular reaction, which eventually induces graft failure. Our goal is to study the role of cytokines in the pathogenesis of this reaction, using the model of alginate poly-L-lysine microcapsule implantation into Wistar rat epididymal fat pads (EFP). The specific objective of this study was to determine the time course of transforming growth factor (TGF)- β_1 mRNA expression by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Microcapsules induced an increase of TGF- β_1 mRNA expression that reached a maximum 14 days after implantation. Seven, 14, 30, and 60 days after microcapsule implantation, the expression of TGF- β_1 mRNA was significantly higher in pericapsular infiltrate cells than in nonimplanted EFP cells ($p < 0.05$, $p < 0.0001$, $p < 0.005$, and $p < 0.01$, respectively). Injection of physiological saline induced a small and gradual augmentation of TGF- β_1 mRNA expression with a maximum 30 days after injection ($p < 0.01$ vs. nonimplanted EFP cells). These results demonstrated that microcapsule implantation, in comparison with saline injection, induce an early, extended, and amplified TGF- β_1 mRNA expression. This suggests that TGF- β_1 plays a role in the pathogenesis of the pericapsular host reaction.

KEY WORDS: microcapsules; biocompatibility; host reaction; TGF- β_1 , time-course

INTRODUCTION

Immunoisolation of living cells in semipermeable membranes has been proposed to protect transplanted cells against the immune system.¹ For example, transplantation of alginate-poly-L-lysine microencapsulated islets of Langerhans has reversed hyperglycemia in diabetic animals.² Microcapsule membranes have been shown to protect the graft against immune cells,^{3,4} antibodies,⁵ and complement proteins.⁶ However, reproducibly successful results have not been reported and graft failure is always associated with a host reaction that eventually develops around implanted microcapsules.⁷⁻¹¹ This host reaction to microcapsule (HRM) is similar to a foreign body reaction to biomaterials because a pericapsular fibrosis reaction develops around unseeded as well as islet bearing microcapsules.^{12,13} The pericapsular infiltrate is composed of cells involved in foreign body reaction and fibrosis such as fibroblasts, fibrocytes, giant cells, macrophages, granulocytes, and collagen.¹³ The HRM may be caused by inadequate encapsulation.^{11,14,15} This general term includes broken capsules, which are always triggering a pericapsular reaction,^{12,16} incomplete coating of poly-L-lysine,^{13,16} nonspherical, and unsmoothed capsules.^{13,17-19} Successful transplantation of microencapsulated cells is therefore directly related to the biocompatibility of the microcapsule materials.

To develop strategies to reduce the HRM, it is necessary to understand the pathophysiological mechanisms involved in this reaction. Methods *in vitro* have been developed to evaluate microcapsule biocompatibility and to identify the components responsible for the induction of the HRM.^{14,20-22} These methods were developed to study a specific immune cell type and to evaluate various biomaterials. In contrast to *in vitro* tests, *in vivo* methods can be used to study the complex interactions between diverse cell types and the evolution of HRM in time.

Attempts have been made to identify the cell types involved in pericapsular infiltrates.^{9,13,23} To our knowledge, little effort has been made to identify the cellular mediators responsible for the development and control of the HRM. The characterization of the expression profile of cytokines involved in the HRM would be very useful for the understanding of the mechanisms involved in this reaction, the development of diagnostic tests to identify components inducing this reaction, and the design of strategies to reduce

HRM. Because the pericapsular reaction shares some similarities with fibrosis disorders, the study of fibrogenic cytokines is relevant. Transforming growth factor (TGF)- β_1 , a major initiator of fibrosis reactions, induces fibroblast cell growth and stimulates the expression, synthesis, and release of collagen, fibronectin, and tissue inhibitors of metalloproteinases.^{24–26}

Our goal is to study the role of cytokines in the pathogenesis of the host reaction to unseeded microcapsules (no cells are contained within microcapsules), using the model of alginate-poly-L-lysine microcapsule implantation into rat epididymal fat pads (EFP). The specific objective of this study was to determine the time course of TGF- β_1 mRNA expression by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).²⁷ The results of the present study demonstrated that TGF- β_1 mRNA was increased in pericapsular infiltrates 7, 14, 30, and 60 days after microcapsule implantation, suggesting that this cytokine is involved in the HRM.

MATERIALS AND METHOD

Microcapsule preparation

Alginate beads were produced by extruding 1.8% sodium alginate (Kelco, Clark, NJ) –0.5% dextran blue (MW 2×10^6) into a 1.45% CaCl_2 solution. The droplets were produced with the use of an electrostatic pulse generator²⁸ allowing the production of calcium alginate beads of approximately 250 μm . Microcapsules were prepared according to the procedure described by Sun and O'Shea.²⁹ Microcapsule diameter ranged from $325 \pm 5 \mu\text{m}$ to $351 \pm 17 \mu\text{m}$ (average \pm standard deviation).

Implantation procedure and immune cell isolation

The implantation procedure was performed as described previously using male Wistar rats (333 to 532 g).³⁰ Briefly, under isoflurane anaesthesia, a midline abdominal incision was made. The EFP were then gently pushed out through the incision. The order of exit of the fat pads was random to prevent any bias. One thousand small microcapsules were implanted into one fat pad, cautiously avoiding major blood vessel perforation, by inserting a 16-gauge I.V. catheter. The length of the insertion was approximately 1.5 cm and the injection lasted less than 5 s. The contralateral fat pad received a mock injection of physiological saline using the same procedure. The resulting pocket contained the same volume for both microcapsules and physiological saline. The fat pads were returned into place, and the abdominal wall and skin were sutured with 5-0 silk. For each of the time points, six rats were used (six fat pads for microcapsule implantation and six fat pads for saline injection). Other controls included noninjected fat pads of five rats. Protocols were reviewed and stated conformed to the ethical guidelines of the Canadian Council for Animal Care by an institutional committee and these guidelines were observed throughout the study. Immune cell isolation of the fat pad was performed by enzymatic digestion as described previously.³¹ Briefly, 3, 7, 14, 30, 60, and 90 days after surgery, implanted and nonimplanted EFP were excised and were kept in ice-cold HBSS and minced on ice. The minced tissue was digested with 75 mg Collagenase P (Roche Diagnostics, Laval, QC) and 25 mg Trypsin (Roche Diagnostics) at 37°C for 2 to 3 min. Total cell count and viable cell number were determined by Trypan Blue exclusion using a hemacytometer. Approximately 300,000 cells from the cellular suspension were used to make a cytocentrifuge preparation or cytopspin. Cells were then stained with Wright-Giemsa (Sigma, St. Louis, MO) and

differential counting of cell types was performed by a blind observer. It is noteworthy that, after digestion and isolation procedures, fibroblasts lost their typical fusiform morphology, and could not be specifically identified. However, considering the results of previous histological studies, fibroblasts are presumably the most important cell component identified as “others.”

Total RNA isolation and semiquantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from the immune cell suspension with the TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) according to a modified procedure of the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi.³² One milliliter of TriPure Isolation Reagent was used for each 5×10^6 dissociated cells. Total RNA concentration and purity were determined by UV-light absorbency at 260 and 280 nm. Genomic DNA contamination of the total RNA samples was removed by treatment with 10 U DNase I RNase-free (Roche Diagnostics) at 37°C for 15 min in the presence of 20 U of RNase Inhibitor (Roche Diagnostics). Total RNA was stored at -80°C before use in first-strand cDNA synthesis. First-strand cDNA synthesis was performed using 1 mg of total RNA as described previously.³¹ cDNA samples were stored at -20°C before use in PCR. The semiquantitative PCR was performed as described previously.³¹ Briefly, 1:100 of the cDNA samples was used for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and TGF- β_1 PCR. Primers for GAPDH and TGF- β_1 were used in the same reaction (multiplex PCR) to compensate for variations in RNA isolation, initial quantification errors, and tube-to-tube variations in RT and PCR reactions. Sense primers were ³²P-radiolabeled with T4 polynucleotide kinase (Life Technologies, Burlington, ON). The PCR reactions were performed in duplicate on the GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Canada, Montréal, QC). PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. All PCR products were of the expected size, and their identity was confirmed by performing nested PCR with specific oligonucleotide primers internal to the original primers.³¹ Bands were excised from the gel and the relative amount of amplified cDNA was then determined by liquid scintillation counting. Data of semiquantitative RT-PCR are expressed as the ratio of TGF- β_1 amplification products (in cpm) on the GAPDH amplification products (in cpm).

Statistical analysis

Data are presented as average \pm S.E.M. One-way analysis of variance with 13 levels was performed. The homogeneity of variance between the 13 levels was confirmed using the Bartlett test, and the average results were compared by the Fisher's protected least significant difference multiple range test (significance level of 5%).

RESULTS

Seven, 14, 30, and 60 days after microcapsule implantation, the semiquantitative RT-PCR gene expression analysis revealed that TGF- β_1 mRNA levels were significantly higher in pericapsular infiltrate cells than in nonimplanted EFP cells (Fig. 1). The TGF- β_1 gene overexpression progressed rapidly, reached a peak at 14 days, and decreased but remained significant at 30 and 60 days. There was no significant differences in TGF- β_1 mRNA levels between the controls and the pericapsular infiltrate cells at 3 or 90 days postimplantation (Fig. 1).

To distinguish the reaction against the microcapsules from the reaction resulting from the implantation procedure, a saline solution was injected in the EFP. Three, 7, 14, 60, and 90 days after saline injections, there was no significant difference in the TGF- β_1 mRNA levels between the controls and the saline-injected EFP cells (Fig. 1). TGF- β_1 message was significantly higher in saline-injected EFP cells than in nonimplanted EFP cells at 30 days postinjection (Fig. 1).

For each time point, the TGF- β_1 mRNA level in pericapsular infiltrate cells was higher than in saline-injected EFP cells with a significant difference at 14 and 60 days ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively).

The result of the cytocentrifuge histological analysis is summarized in Table I. The percentage of macrophages, eosinophils, neutrophils, and lymphocytes reached a maximum within the first week after microcapsule implantation or saline injection, and then returned gradually to basal levels. There were significant changes in the percentage of basophils. The percentage of fibroblasts, fibrocytes, Langerhans' cells, keratinocytes, giant cells, and other cells (all regrouped as others) decreased within the first 3 days and then gradually returned to basal levels.

In general, the presence of microcapsules amplified and prolonged the host reaction because the percentage of macrophages, eosinophils, neutrophils, lymphocytes, and "other cells" (fibroblasts in majority) returned to basal levels much slower than in saline-injected controls (Table I).

DISCUSSION

To implant microcapsules in the EFP, a small puncture is made into the adipose tissue creating a potential injury site. A mock injection of physiological saline was used as a control to evaluate the reaction resulting from the implantation procedure. From 3 to 30 days after saline injection, there was a slight and progressive increase in TGF- β_1 mRNA levels, with a peak and only significant level at 30 days, and a return to the basal level at 60 days. The process of wound healing is divided in three phases: inflammation, tissue granulation, and matrix regeneration and remodeling. The first two phases last usually 14 days leaving place for the matrix regeneration and remodeling phase that can last up to 100 days. TGF- β_1 is known to stimulate fibronectin, collagen, and other extracellular matrix proteins deposition.^{24,33–35} In addition, TGF- β_1 modulates the extracellular matrix remodeling process by its action on integrins, proteases, and protease inhibitors.²⁶ Therefore, our results are in agreement with the model of wound healing because TGF- β_1 mRNA levels reached a maximum at 30 days which is a time period associated with intense matrix remodeling and collagen accumulation.³⁶

As compared with saline injection, implantation of unseeded microcapsules induced an earlier, amplified, and extended TGF- β_1 mRNA expression. This reaction peaked at 14 days, then decreased slowly, though remaining significant at 30 and 60 days. The reaction to saline injection increased more slowly, and peaked at 30 days, the only significant time. The fact that, at 30 days, the reaction to microcapsules is on the descending part of the curve, and the reaction to saline is at its peak explains why, at this time, the difference between microcapsule and saline injections is not significant. In general, the body reacts against a foreign material by attempting to dissolve it, extrude it, or failing these processes, to encapsulate it. When foreign material persists at the site of inflammation, monocytes proliferate and develop into additional macrophages. In time, fibroblasts surround this cluster and lay down collagen and enclose the foreign material in a dense and fibrous capsule.³⁷ This may explain why there is still a TGF- β_1 response at 60 and 90 days after microcapsule implantation.

These results suggest that TGF- β_1 , a potent fibrogenic growth factor, plays a role in the development of pericapsular fibrosis. We have shown previously that a pericapsular

fibrosis reaction, with collagen accumulation, takes place 2 weeks after microcapsule implantation into rat EFP.³⁰ Others have shown that fibroblasts predominantly express TGF- β isoforms and receptors in the maintenance stage of the human reaction process against foreign bodies.^{38,39}

Microcapsule implantation results in injury and initiation of the inflammatory response with an increase in the percentage of granulocytes, neutrophils in particular, macrophages, and lymphocytes. The components of the inflammatory response to biomaterials or artificial organs are acute and chronic inflammation, foreign body reaction with granulation tissue, and macrophages and foreign body giant cells interactions.⁴⁰ The normal foreign body reaction consists of macrophages and foreign body giant cells at the surface of the implant with subjacent fibroblastic proliferation and collagen deposition.⁴⁰ The comparison between the time course of TGF- β_1 mRNA expression as opposed to the time course of macrophage involvement in the host reaction suggests that macrophages are not the only cell type responsible for the production of TGF- β_1 . Although macrophages are likely to be the principal cell type producing TGF- β_1 ,^{24,41} the actual contribution of different cell types will have to be defined. For some authors, pericapsular fibrosis is the final result of a humoral response directed against the graft because, in their hands, graft-bearing capsules have triggered a stronger reaction than empty capsules.^{9,23,42-44} T-helper lymphocytes have been identified within pericapsular infiltrates.^{9,23,42} The cause of this reaction is likely to be an incomplete encapsulation with islets protruding out of the capsule.^{11,14,45} Another cause may be antigens released from the islets⁴⁶⁻⁴⁸ or shed antigens from passenger macrophages⁴⁹ within encapsulated islets. These antigens, which can pass through the membrane, may drive the reaction toward a humoral response. In our opinion, early graft failure is associated with a foreign body reaction against the immunoisolation devices and later graft failure may be the result of a humoral response.

In conclusion, it was shown that TGF- β_1 mRNA is increased in pericapsular infiltrates 7, 14, 30, and 60 days after microcapsule implantation. This suggests that TGF- β_1 plays a role in the pathogenesis of the host reaction to microcapsules. The cellular events seem to lead toward a foreign body encapsulation reaction with macrophage and fibroblast accumulation. The results of this study will shed light on the mechanisms underlying the host reaction to microcapsules.

ACKNOWLEDGEMENT

Contract grant sponsor: Canadian Diabetes Association and the Medical Research Council of Canada (contract grant number: MA-14435). Robert Robitaille received a joint student fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche and a student fellowship from the Association Diabète Québec.

REFERENCES

1. Chang TMS. Semipermeable microcapsules. *Science* 1964;146: 524–526.
2. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980;210:908–910.
3. Soon-Shiong P, Lu Z-N, Grewal I, Lanza RP, Clark W. An *in vitro* method of assessing the immunoprotective properties of microcapsule membranes using pancreatic and tumor cell targets. *Transplant Proc* 1990;22:754–755.
4. Soon-Shiong P, Lu Z-N, Grewal I, Lanza R, Clark W. Prevention of CTL and NK cell-mediated cytotoxicity by microencapsulation. *Horm Metab Res* 1990;25(Suppl 1):215–219.
5. Halle J-P, Bourassa S, Leblond FA, Chevalier S, Beaudry M, Chapdelaine A, Cousineau S, Saintonge J, Yale J-F. Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Transplantation* 1993;55:350–354.
6. Soon-Shiong P, Heintz R, Yao Z, Yao Q, Sanford P, Lanza RP, Meredith N. Glucose-insulin kinetics of the extravascular bioartificial pancreas: A study using microencapsulated rat islets. *ASAIO J* 1992;38:851–854.
7. Ricker A, Stockberger S. Hyperimmune response to microencapsulated xenogenic tissue in NOD mice. *Diabetes* 1986;35(Suppl 1):61A.
8. Darquy S, Chicheportiche D, Capron F, Boitard C, Reach G. Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different diabetic models in mice. *Horm Metab Res Suppl* 1990;25:209–213.
9. Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T, Wicker L, Rajotte R, D'Agati V, Peterson L, Norton J, Reemtsma K. The role of CD4⁺ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. *Transplantation* 1990;49:396–404.
10. Lum Z-P, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM. Xenografts of rat islets into diabetic mice. *Transplantation* 1992;53:1180–1183.
11. De Vos P, de Haan BJ, Pater J, van Schilfgaarde R. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation*. 1996;62:893–899.
12. Cole DR, Waterfall M, McIntyre M, Baird JD. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: A possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* 1992;35:231–237.

13. Fritschy WM, De Vos P, Groen H, Klatter FA, Pasma A, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats. *Transplant Int* 1994;7:264–271.
14. De Vos P, De Haan B, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1996;62:888–893.
15. Van Schilfgaarde R, De Vos P. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J Mol Med* 1999;77:199–205.
16. Van Schilfgaarde R, De Vos P. Aspects of immunoprotection of islets. *Transplant Proc* 1996;28:3516–3517.
17. Lum Z-P, Tai IT, Krestow M, Norton J, Vacek I, Sun AM. Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. *Diabetes* 1991;40:1511–1515.
18. Colton CK, Avgoustiniatos ES. Bioengineering in development of the hybrid artificial pancreas. *J Biomech Eng* 1991;113:152–170.
19. Lanza RP, Borland KM, Staruk JE, Appel MC, Solomon HA, Chick WL. Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/W or rats without immunosuppression. *Endocrinology* 1992;131:637–642.
20. Otterlei M, Ostgaard K, Skjak-Braek G, Smidsrod O, Soon-Shiong P, Espevik T. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother* 1991;10:286–291.
21. Pueyo ME, Darquy S, Capron F, Reach G. In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules. *J Biomater Sci Polym* 1993;5:197–203.
22. Zimmermann U, Klock G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG, Horcher A, Entenmann H, Sieber U, Zekorn T. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* 1992;13:269–274.
23. Wijsman J, Atkinson P, Mazaheri R, Garcia B, Paul T, Vose J, O'Shea G, Stiller C. Histological and immunopathological analysis of recovered encapsulated allogenic islets from transplanted diabetic BB/W rats. *Transplantation* 1992;54:588–592.
24. Kovacs EJ. Fibrogenic cytokines: The role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* 1991;12:17–23.
25. Kovacs EJ, Dipietro LA. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J* 1994;8:854–861.

26. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor B in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286–1292.
27. Robitaille R, Leblond FA, Henley N, Prud'homme GJ, Drobetsky E, Halle J-P. Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: A novel method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates. *J Biomed Mater Res* 1999; 45:223–230.
28. Halle J-P, Leblond FA, Pariseau J-F, Jutras P, Brabant M-J, Lepage Y. Studies on small (<300 μm) microcapsules. II. Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 1994;3:365–372.
29. Sun AM, O'Shea GM. Microencapsulation of living cells: long-term delivery system. *J Controlled Release* 1985;2:137–141.
30. Pariseau J-F, Leblond FA, Harel F, Lepage Y, Halle J-P. The rat epididymal fat pad as an implantation site for the study of microcapsule biocompatibility: Validation of the method. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1331–1335.
31. Robitaille R, Leblond FA, Bourgeois Y, Henley N, Loignon M, Halle J-P. Studies on small (<350 μm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and proteins permeation through microcapsules by reverse size exclusion chromatography. *J Biomed Mater Res*, to appear.
32. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
33. Ignatz RA, Endo T, Massague J. Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor-B. *J Biol Chem* 1986;262:6443–6446.
34. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type B: Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167–4171.
35. Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillan JJ, Akiyama SK, Yamada SS, Chen W-T, Yamada KM, McDonald JA. Transforming growth factor B stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1988;263:4586–4592.
36. Wokalek H, Ruh H. Time course of wound healing. *J Biomater Appl* 1991;5:337–362.
37. Lammers RL. Soft tissue foreign bodies: *Annals of emergency medicine* 1988;17:1336–1347.

38. Katou F, Ohtani H, Nagura H, Motegi K. Procollagen-positive fibroblasts predominantly express fibrogenic growth factors and their receptors in human encapsulation process against foreign body. *J Pathol* 1998;186:201–208.
39. Lossing C, Hansson H-A. Peptide growth factors and myofibroblasts in capsules around human breast implants. *Plast Reconstr Surg* 1993;91:1277–1286.
40. Anderson JM. Inflammatory response to implants. *Trans Am Soc Artif Int Org* 1988;XXXIV:101–107.
41. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, Raines EW, Ross R, Sporn MB. Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6020–6024.
42. Weber C, Ayres-Price J, Constanzo M, Becker A, Stall A. NOD mouse peritoneal cellular response to poly-L-lysine-alginate microencapsulated rat islets. *Transplant Proc* 1994;26:1116–1119.
43. Jesser C, Kessler L, Lambert A, Belcourt A, Pinget M. Pancreatic islet macroencapsulation: A new device for the evaluation of artificial membrane. *Artif Organs* 1996;20:997–1007.
44. Kessler L, Jesser C, Lombard Y, Karsten V, Belcourt A, Pinget M, Poindron P. Cytotoxicity of peritoneal murine macrophages against encapsulated pancreatic rat islets: *In vivo* and *in vitro* studies. *J Leukocyte Biol* 1996;60:729–736.
45. De Vos P, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Possible relationship between fibrotic overgrowth of alginate-polylysine-alginate microencapsulated pancreatic islets and the microcapsule integrity. *Transplant Proc* 1994;26:782–783.
46. Hsu BRS, Ho YS, Fu SH, Huang YY, Chiou SC, Huang HS. Membrane compactness affects the integrity and immunoprotection of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. *Transplant Proc* 1995;27:3227–3231.
47. Colton CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* 1995;4:415–436.
48. Lanza RP, Beyer AM, Chick WL. Xenogeneic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers. *Transplantation* 1994;57:1371–1375.
49. Fraser RB, MacAulay MA, Wright JR, Sun AM, Rowden G. Migration of macrophage-like cells within encapsulated islets of Langerhans maintained in tissue culture. *Cell Transplant* 1995;4:529–534.

TABLE

Table I: Cells Involved in Host Reaction to Microcapsules.

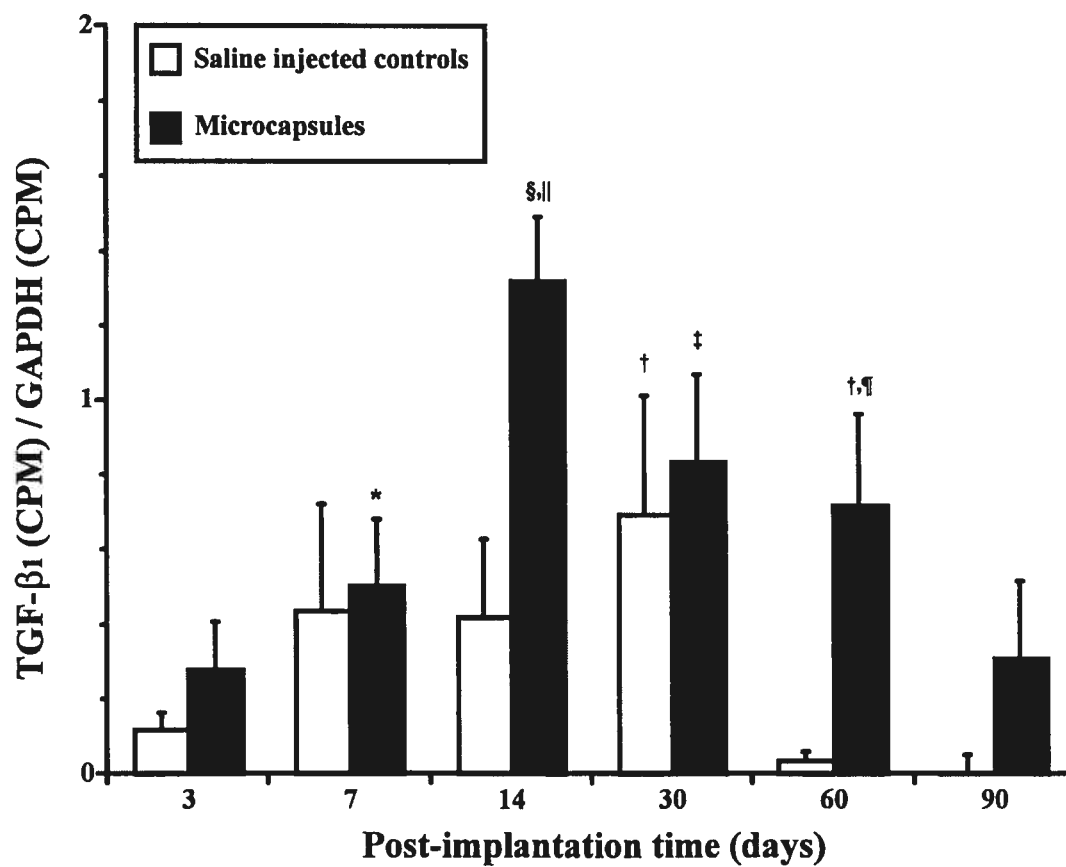
Cell types	Percentage (%)					
	Time post-implantation (days)					
	3	7	14	30	60	90
Non-injected controls						
Macrophages	26.8±2.1					
Eosinophils	0.2±0.1					
Basophils	1.5±0.4					
Neutrophils	0.5±0.3					
Lymphocytes	4.2±0.5					
Others	66.7±2.1					

Saline injected controls							
Macrophages	59.8±1.7*	53.9±1.7*	32.8±1.6 [§]	27.2±3.1	18.8±1.8 [†]	23.9±2.0	
Eosinophils	3.4±0.9*	2.5±0.3 [†]	0.3±0.1	0.8±0.2	0.0±0.0	0.1±0.1	
Basophils	0.9±0.2	1.6±0.3	2.4±0.2	2.2±0.6	1.4±0.3	0.9±0.2	
Neutrophils	3.5±0.5 [§]	2.4±0.6	0.2±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	0.3±0.2	
Lymphocytes	13.7±1.6*	6.3±1.2	1.8±0.5	4.8±1.1	3.8±0.7	3.0±0.6	
Others	18.8±3.2*	33.3±1.7*	62.5±2.0	64.8±4.8	75.7±2.1 [§]	71.9±2.8	
Microcapsules							
Macrophages	52.1±1.5*	55.6±2.0*	43.5±1.8* [¶]	38.4±1.6* [¶]	22.8±2.0	18.4±1.4 [†]	
Eosinophils	2.1±0.8 [†]	3.1±0.5*	1.4±0.2	2.6±1.3 [†]	0.7±0.4	0.3±0.2	
Basophils	1.1±0.4	2.1±0.4	1.7±0.2	1.7±0.7	0.7±0.2	1.1±0.4	
Neutrophils	5.3±2.0 [†]	4.5±2.9 [†]	1.0±0.1	0.7±0.1	0.3±0.1	0.5±0.2	
Lymphocytes	14.7±0.8*	6.1±0.9	3.4±0.5	6.4±1.8	3.8±1.0	6.9±0.7 [§]	
Others	24.7±2.7*	28.6±2.8*	49.0±2.2* [¶]	50.3±2.9* [¶]	71.7±2.9	73.0±2.2	

[§] p < 0.05, [†] p < 0.01, ^{††} p < 0.001, * p < 0.0001 vs. non-injected controls; ^{||} p < 0.05, [¶] p < 0.001 vs. saline injected controls.

FIGURE

Figure 1



LEGEND FOR FIGURE

Figure 1. Relative TGF- β_1 gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. Data of semiquantitative RT-PCR are expressed as the ratio of TGF- β_1 amplification products (in cpm) on the GAPDH amplification products (in cpm). The value of the noninjected controls was subtracted from the other values as a background value. Thirty-three PCR cycles were performed and PCR experiments were performed in duplicate. For each condition at each time point $n = 6$ except for noninjected controls where $n = 10$, 7 days postinjection of saline where $n = 4$ and 60 days postinjection of saline where $n = 5$. * $p < 0.05$, $^{\dagger}p < 0.01$, $^{\ddagger}p < 0.005$, $^{\S}p < 0.0001$ versus noninjected controls. $^{\P}p < 0.05$, $^{\parallel}p < 0.005$ versus saline-injected controls.

D.2. Étude 2. Peritoneal cellular and molecular reactions following saline and alginate-poly-L-lysine microcapsule injections

Robert Robitaille, Julie Dusseault, Nathalie Henley, Karine Desbiens et Jean-Pierre Hallé
En préparation pour soumission à « Biomaterials ».

Rôle des coauteurs :

Julie Dusseault, Nathalie Henley et Karine Desbiens ont participé à la collecte des données, l'analyse des résultats ainsi qu'à la révision de l'article scientifique. Jean-Pierre Hallé a participé à la conception du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'ai fait une contribution majeure en participant activement à la conception du projet, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'étais le premier responsable des travaux et des résultats de recherche donnant lieu à cet article.

PERITONEAL CELLULAR AND MOLECULAR REACTIONS FOLLOWING SALINE
AND ALGINATE-POLY-L-LYSINE MICROCAPSULE INJECTIONS

Robert Robitaille[†], Julie Dusseault[†], Nathalie Henley[†], Karine Desbiens[†] and Jean-Pierre
Hallé^{†,§}

[†]Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec,
H1T 2M4, Canada

Running Title: Peritoneal reaction to microcapsules.

[§]To whom correspondence should be addressed:

Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Canada

Fax: (514) 252-3430



SUMMARY

Transplantation of microencapsulated islets is impaired by a pericapsular host reaction (HRM), which induces graft failure. Our goal is to analyze the cellular and molecular mechanisms behind the HRM. At 48, 96 and 168 hours, the peritoneal cell number was significantly higher after microcapsule implantation than after mock implantation ($p < 0.05$). Between 48 and 168 hours, microcapsules provoked an increase in macrophage and lymphocyte number clearly different from the increase generated from mock implantation ($p < 0.05$). In contrast to mock implantation, microcapsules provoked an increase in $\text{TNF-}\alpha$ (at 3, 48, 96 and 168; $p < 0.0001$ at 168 hours) and $\text{TGF-}\beta_1$ mRNA (gradual increase with a significant peak at 168 hours; $p < 0.05$). An increase in $\text{IL-1}\beta$ (3 and 168 hours; $p < 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively) and IL-6 (3 hours; $p < 0.0001$) mRNA expression was observed in peritoneal cells following microcapsule implantation. Mock implantation provoked a significant increase in $\text{IL-1}\beta$ and IL-6 mRNA (3 hours; $p < 0.005$ and $p < 0.0001$ respectively). However this increase was of a lower magnitude than the one observed after microcapsule implantation. Our results confirm that macrophages play a role in the HRM and demonstrate that $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 and $\text{TGF-}\beta_1$ are involved in the pathogenesis of the HRM.

KEY WORDS: biocompatibility, macrophage, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta_1$.

INTRODUCTION

Pancreas and islets transplantation are currently the only two treatments available for type 1 diabetes that can yield insulin independence [1]. However, due to the required immunosuppression regimen and shortage of human donor pancreas, these treatments are restricted to very labile [2] or multi-grafted patients [3-6]. As a proposed alternative, transplantation of microencapsulated islets or xenoislets can yield insulin independence in various animal models without the use of immunosuppressive drugs [7-12]. However, graft function is never indefinite and varies considerably from a few days to almost 2 years [9, 13]. The graft dysfunction is generally associated with an overgrowth at the periphery of the microcapsules [14-25]. This host reaction against microcapsules (HRM) can be observed as soon as 3 days post-encapsulation [26]. The HRM can be associated with a foreign body reaction since it can be triggered by islets-seeded as well as empty microcapsules [14, 24, 26]. Microcapsule biocompatibility is therefore a major issue in the development of an endocrine bioartificial pancreas, as well as in other types of encapsulated cell transplantation.

A thorough understanding of the mechanisms involved in the host reaction to microcapsules is important to design methods for the evaluation, selection, and development of biomaterials of enhanced biocompatibility or, alternatively, to design systemic or local treatments to control this reaction. Attempts have been made to identify the microcapsule components that induce the HRM [19, 24, 26-28]. *In vitro* experiments have shown that beta 1-4-linked D-mannuronic acids (poly-M, high-M alginate and M-blocks) stimulate monocytes to produce tumour necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) [29-31]. The mannuronic acid residues and LPS may stimulate monocytes to produce TNF- α by similar mechanisms and may bind to a common receptor (CD14) [32-34]. In addition, IL-1 β release and intracellular IL-1 β and IL-1 α production were significantly higher when macrophages were cultured with alginate-poly-L-lysine microcapsules than when macrophages were cultured alone [35].

Most *in vivo* studies on microcapsule biocompatibility have focused on the cell biology approach using intraperitoneal transplantation of microencapsulated islets into

diabetic rats. Histological studies of the pericapsular infiltrates and analysis of the cellular reaction represent the obvious first step in the investigation of the *in vivo* reaction [14, 17, 24, 36]. However, the knowledge acquired and, most importantly, the potential for interventions derived from this methodology, are limited. The molecular biology approach to characterize the cytokine profile and time-course following microcapsule implantation would be very useful for the understanding of the mechanisms involved in the host reaction to microcapsules, and could form the basis of diagnostic tests to identify microcapsule components or characteristics inducing this reaction. Furthermore, cytokines may be targets for interventions to control the HRM. The use of cell and molecular biological approach to understand the mechanisms involved in the HRM is a prerequisite for the rational development of a microcapsule with optimal biocompatibility [37, 38].

The HRM is poorly understood and several factors may play a role in the induction and development of this reaction. One hypothesis is that microcapsules can stimulate complement, leading to the release of products such as C5a. C5a, in turn, is able to stimulate macrophages to release cytokines implicated in foreign body reaction and pericapsular fibrosis. TNF- α , IL-1 β and IL-6 play important roles in immune responses and in inflammatory reaction [39-42]. TNF- α and IL-1 β are inflammatory cytokines with potent fibroblast growth activity [41, 43, 44]. While IL-1 β is reported to be cytotoxic and cause functional impairment and lysis of islet cells [45-49], TNF- α enhances adherence of neutrophils and monocytes, promotes migration of inflammatory cells into the intercellular matrix and triggers local production of other proinflammatory cytokines [50]. Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β_1) is one of the most potent fibrogenic cytokines. It acts directly as an inducer of fibroblast cell growth [51-54]. It stimulates the expression of collagen and fibronectin genes as well as the synthesis and release of these matrix proteins [51, 53-55]. It is a powerful stimulator of tissue inhibitor of metalloproteinase release by fibroblasts [56]. The inhibition of metalloproteinases, such as collagenase, affects the balance between collagen deposition and clearance, and promotes the formation of fibrotic scar tissue. Following microcapsule implantation into rat epididymal fat pads, it was shown that microcapsule induce TGF- β_1 mRNA expression in pericapsular cells [57]. This suggests that TGF- β_1 plays a role in the pathogenesis of the pericapsular host reaction.

Our goal is to study the cellular and molecular mechanisms underlying the HMR in order to develop potential interventions to overcome this reaction. The specific objectives were **1-** to determine the time course of the peritoneal cellular reaction to alginate-poly-L-lysine microcapsules implanted in Wistar rats, **2-** to identify the cell types involved by histological staining and **3-** to determine the time course of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and TGF- β_1 mRNA expression by semi-quantitative RT-PCR. Our results **1-** suggest that the implantation procedure produced a temporary cellular reaction while microcapsules amplify and prolong this reaction, **2-** confirm that macrophages and lymphocytes play a role in the HRM and **3-** demonstrate that TNF- α , IL-1 β , IL-6 and TGF- β_1 are involved in the pathogenesis of the HRM.

MATERIAL AND METHODS

Microcapsule production

Microcapsules were made according to a previously published procedure [58]. Briefly, sodium alginate 1.8 % (Keltone LV, ISP Alginates Inc., San Diego, CA) was extruded through a 22 G needle with an electrostatic pulse generator, into a 1.45% calcium chloride bath. The beads were successively coated according to a modification of Sun's procedure [59] with poly-L-lysine 0.05 % (23.8 kDa, Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada), alginate 0.18 % and the alginate core was further liquefied with sodium citrate 55mM. The mean microcapsule diameter herein produced was $330 \pm 10 \mu\text{m}$.

Microcapsule implantation

Adult male Wistar rats (Charles River, St-Jean, QC, Canada) weighting approximately 250-300 g at the time of transplantation were used. Approximately 5000 capsules, suspended in 2 mL of 0.9 % saline solution, were implanted into the peritoneal cavity via a 16 G I.V. catheter. The injection lasted less than 5 s. Three experimental groups were studied: 1- rats who underwent capsule implantation, 2- sham operation (0.9 % physiological saline injection; Abbott Laboratories Ltd., Montréal, QC, Canada) and 3- non-operated control. Protocols were reviewed and stated to conform to the ethical guidelines of the Canadian Council for Animal Care by the animal care ethic committee of Guy-Bernier Research Center of Maisonneuve-Rosemont Hospital. These guidelines were observed throughout the study.

Peritoneal washing and cell isolation

Three hours to 7 days after implantation, peritoneal washings were performed and peritoneal fluid and microcapsules were recuperated. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (Abbott Laboratories Limited, Montréal, QC, Canada) and a small ventral incision was made. Fifty mL of saline was injected taking care to irrigate all exposed organs. The fluid added was then gently transferred by pipette into sterile propylene tubes. All steps were performed on ice. This procedure was repeated three times giving a final volume of 150 mL. Greater than 95% of the added fluid was removed. Microcapsules were separated from the cells with a $100 \mu\text{m}$ nylon mesh sieve and washed three times with saline. The recuperated cells were kept on ice and washed with ice cold HBSS. Erythrocyte

lysis was performed by incubating the peritoneal cells with a 155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 127 μM EDTA solution at room temperature for 2 min. The lysis reaction was stopped by extensive washing with ice cold HBSS + 10 % FBS. Total cell count was performed by Trypan Blue exclusion method using an hemacytometer. Cytocentrifuges were made and evaluated using Wright-Giemsa staining. Recuperated microcapsules were evaluated under inverted-light microscope and the number of microcapsules showing a pericapsular reaction was determined.

Total RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from the immune cell suspension with the TRIZOL Reagent (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada) according to a modified procedure of the single-step RNA isolation method [60]. One mL of TRIZOL Reagent was used for each 10×10^6 peritoneal cells. Total RNA concentration and purity were determined by UV-light absorbency at 260 and 280 nm. Genomic DNA contamination of the total RNA samples was removed by treatment with 10 U DNase I RNase-free (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada) at 37 °C for 15 min in presence of 20 U of RNase Inhibitor (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada). Total RNA was stored at -80 °C prior to use in first strand cDNA synthesis. First-strand cDNA synthesis was carried out using 1 μg of total RNA as previously described [57, 61]. cDNA samples were stored at -20 °C prior to use in PCR.

Semi-quantitative PCR

The semi-quantitative PCR was performed as previously described [57, 61]. Briefly, 1/100 of the cDNA samples were used for GAPDH, IL-1 β , IL-6, TNF- α and TGF- β_1 PCR. Table 1 gives the sequence of each primer and experimental conditions used for the PCR. Sense primers were ^{32}P -radiolabeled with T4 polynucleotide kinase (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada). The PCR reactions were performed in triplicate on the GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer Ltd., Mississauga, ON, Canada) with the following profile: 30 s denaturation at 94 °C, 15 s annealing, 25 s extension at 72 °C. An initial denaturation step at 94 °C for 2.5 min and a final extension step at 72 °C for 7 min were also performed. PCR products were analysed by 2 % agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. All PCR products were of the expected size, and their

identity was confirmed by performing nested PCR with specific oligonucleotide primers internal to the original primers [57, 61]. Bands were excised from the gel and the relative amount of amplified cDNA was then determined by liquid scintillation counting. The results of semi-quantitative RT-PCR are expressed as the ratio of the cytokine amplification products (in cpm) on the GAPDH amplification products (in cpm). The data is then expressed as a percentage of non-injected controls (background value).

Statistical analysis

For each condition at each time point $n=6$. Data are presented as mean \pm S.E.M. One-way analysis of variance with 11 levels was performed. The homogeneity of variance between the 11 levels was confirmed using the Bartlett test, and the average results were compared by the Fisher's Protected Least Significant Difference multiple range test (significance level of 5 %).

RESULTS

The percentage of recovered microcapsules after peritoneal implantation generally diminishes with time (Table 2). Eighty-five to 95 % of the recovered microcapsules, between 3 hours and 168 days post-implantation, present no pericapsular cellular accumulation and are free-floating. If we presume that unrecovered microcapsules are presenting a strong pericapsular reaction and we combined the unrecovered microcapsules with the ones showing a pericapsular cellular reaction, the percentage of microcapsules presenting a pericapsular reaction generally increases with time (Table 2).

Results of the analysis of immune cells recuperated by peritoneal washings were reproducible with small standard deviations allowing comparative studies. Microcapsule implantation generated a significant increase in the total number of peritoneal inflammatory cells recuperated, as compared to non-implanted controls, at 17, 48, 96 and 168 hours (Figure 1A; $p < 0.001$). Physiological saline solution (microcapsule vehicle) injection also produced a significant elevation of the peritoneal inflammatory cell number at 17, 48 and 96 hours but returned to basal level after 96 hours (Figure 1A; $p < 0.01$). At 48, 96 and 168 hours, the peritoneal inflammatory cell number was significantly higher after microcapsule implantation than after saline injection (Figure 1A; $p < 0.05$).

Macrophage number resulting from microcapsule implantation is elevated between 17 and 168 hours (Figure 1B; $p < 0.01$), and this is clearly different from the increase generated from saline injection between 48 and 168 hours (Figure 1B; $p < 0.05$). From 17 to 168 hours post-transplantation, microcapsules provoke a significant increase in lymphocytes when compared to non-injected controls (Figure 1C; $p < 0.05$). As for macrophages, between 48 and 168 hours post-transplantation there is a significant difference in lymphocytes number after microcapsule implantation when compared to saline injected controls (Figure 1C; $p < 0.05$). This suggests a definitive role for macrophages and lymphocytes in HRM. Neutrophils are the first cell type to be transiently elevated (Figure 1D; 3 and 17 hours). Between 17 and 168 hours post-implantation, microcapsule implantation provokes an increase in eosinophils and mastocytes when compared to non-injected controls (Figures 1E and F). However, since there was no

significant difference in the granulocytes number after microcapsule implantation when compared to saline injection, their role in HRM is not clear.

The time course of TNF- α mRNA expression in peritoneal cells after microcapsule implantation is illustrated in Figure 2A. At 3, 48, 96 and 168 hours post-implantation, the TNF- α mRNA expression was increased in the peritoneal cells of rats implanted with microcapsules when compared to peritoneal cells of non-injected rats ($p < 0.0001$ at 168 hours). It is noteworthy that saline injection did not provoke any increase in TNF- α mRNA expression during the time course under study.

A significant increase in IL-1 β mRNA expression was observed in peritoneal cells, 3 and 168 hours following microcapsule implantation (Figure 2B; $p < 0.0001$ and $p < 0.05$ respectively). Saline provoked a significant increase in IL-1 β mRNA expression 3 hours following injection (Figure 2B; $p < 0.005$).

The peritoneal cells showed a significant increase in IL-6 mRNA expression 3 hours after microcapsule implantation (Figure 2C; $p < 0.0001$). At 17, 48, 96 and 168 hours post-implantation, the IL-6 mRNA expression returned to basal level (Figure 2C). Saline injections did not provoke an increase in IL-6 mRNA expression except at 3 hours following injection (Figure 2C; $p < 0.0001$).

Figure 2D illustrate the time course of TGF- β_1 mRNA expression in peritoneal cells following microcapsule and saline injection. Microcapsule provoke a gradual increase in TGF- β_1 mRNA expression starting at 48 hours post-implantation with a significant peak at 168 hours post-implantation ($p < 0.05$). It is noteworthy that saline injections did not provoke any significant increase in TGF- β_1 mRNA expression.

DISCUSSION

The percentage of recovered microcapsules showing a pericapsular reaction is under 14 %. De Vos has observed a threshold limit over which the host reaction irreversibly evolved toward graft failure [19]. A percentage of overgrown capsules of more than 10 % is always associated with the cessation of graft function [19]. The number of microcapsules not recovered after implantation increases with time. This could not be explained by clumped microcapsules attached to internal organs since at all time points the number of microcapsule clumps attached to liver lobes was very low and not significantly different (data not shown). One possible explanation could be the disruption of microcapsules integrity over time. It is well known that microcapsules made with alginate rich in mannuronic (M) acid are more fragile [62-64]. In addition chelated microcapsules (chelation of microcapsules with citrate or EGTA is a treatment to liquefy the alginate core) tend to lose their integrity [62]. It was shown that broken microcapsules always trigger a strong pericapsular reaction [26]. High-M alginate leaching from the broken microcapsules could also trigger the reaction since mannuronic acid was shown to activate immune cells *in vitro* [29, 30].

Mock implantations, *i.e.* injections of physiological saline, were included in this study to discriminate the HRM from the reaction resulting from the implantation procedure. The mock injection provokes a significant increase in the number of peritoneal leukocytes from 17 hours to 7 days post-injection. These mock injections had no effect on the mRNA expression profile of TNF- α and TGF- β_1 . Early after the implantation procedure, a significant increase in the mRNA expression profile of IL-1 β and IL-6 was observed for a very short period of time. Our results are in agreement with the findings reported by Zekorn who observed an activated peritoneum for at least several weeks after sham operation [65] and by Vandenbossche who observed an elevated number of peritoneal macrophage 4 days after saline injection [66]. However, it is a well-known fact that the choice of the animal model can influence *in vivo* biocompatibility tests [65, 67]. Here we demonstrate that the implantation procedure results in an activated peritoneum, therefore the microcapsules are transplanted in a hostile environment that can trigger a foreign body reaction.

Microcapsule implantation amplifies and prolongs this reaction. In response to microcapsule implantation, the peritoneal leukocyte number did not return to basal level for the entire time course under study, resulting in a chronically activated peritoneum. Three hours after implantation of empty microcapsules we observed a significant increase of TNF- α , IL-1 β and IL-6 mRNA expression for a short period of time before returning to basal level. A significant increase in TNF- α was observed 2 to 7 days following microcapsule implantation, while TGF- β_1 mRNA expression was significantly increased at day 7. The expression profiles observed after microcapsule implantation are clearly different from the expression profiles observed after injection of saline. It is assumed that a fully biocompatible system is achieved with membranes that elicit no foreign body reaction, since overgrowth on the surface of the membrane interferes with optimal diffusion of nutrients and metabolites [24, 62, 68].

The basic pattern of peritoneal activation in response to the microcapsules was established and mimicked that seen in a local inflammatory response. Neutrophils (polymorphonuclears) were rapidly recruited followed by macrophages and lymphocytes. This is in agreement with the pattern observed after subcutaneous alginate implantation [69]. Neutrophils are the first peritoneal cells to be increased after sham or microcapsule implantation. They are the primary effector cells in acute inflammatory reactions induced by foreign materials in the body [70]. However, there is no significant difference in neutrophil number between the sham operation and the implantation of microcapsules. These results suggest that the acute inflammation is caused by the implantation procedure rather than by microcapsules. From 2 to 7 days post-implantation, macrophages are clearly involved in the HRM. It is a well-known fact that macrophages are involved in the host responses against various biomaterials and are known to control the chronic inflammatory response [71-73]. In addition, many studies have suggested a role for the macrophages in the reaction against microcapsules [66, 74, 75]. We (data not shown) and others have identified macrophages in direct contact with the microcapsule membrane in tissue section of pericapsular infiltrates [14, 24, 67, 74, 75]. Lymphocytes are implicated in the immunological reaction to encapsulated islet or xenoislet tissue [17]. We were initially surprised to observe a significant increase in lymphocyte number at different times following implantation of empty microcapsules. The peak in lymphocyte number, observed

2 post-implantation, suggest that the reaction is evolving toward chronic inflammation. Increase in mastocyte and eosinophil number was observed at different times post-implantation. Despite one report suggesting that degranulation of mast cells is involved in the tissue reaction to intraperitoneal polymer implants and the fact that Wistar rats have a high basal level of peritoneal resident eosinophils, their roles in the HRM remain unclear [76].

Numerous *in vitro* studies have shown that high-M alginate can stimulate the production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 from mononuclear cells [29-35]. These cytokines play important role in immune responses and in inflammatory reaction [39-42]. Microcapsules used in our *in vivo* study were made from high-M alginate and triggered the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 at different times after implantation. Hsu has reported the mRNA expression of IL-1 β in peritoneal exudate mononuclear cells after transplantation of microencapsulated xenoislets into streptozotocin-induced diabetic mice [74].

TNF- α is a pivotal mediator of inflammation that activates leukocytes, enhances adherence of neutrophils and monocytes, promotes migration of inflammatory cells into the intercellular matrix and triggers local production of other proinflammatory cytokines such as IL-1 β [50]. Therefore, it is not surprising to observe an increase in expression of this pleiotropic cytokine in peritoneal exudate at different time post-implantation. Our results are in agreement with Hunt findings [77]. He observed that in all samples where macrophages were observed in the periphery of biomaterials after implantation, cells staining positive for TNF- α protein and message also were observed independently of time [77]. The demonstration that at nearly all time point tested, an increase in TNF- α message was observed has significant implications. The influence of TNF- α on the response to microcapsules may represent a balance between its actions promoting biocompatibility and those tending to lead to inflammatory damage, implant impairment and pericapsular fibrosis.

TGF- β_1 acts directly as an inducer of fibroblast cell growth [51-54], while TNF- α and IL-1 β are inflammatory cytokines with potent fibroblast growth activity [41, 43, 44].

These proteins could promote fibroblast colonisation of the implant at a later stage of the reaction. Seven days post-implantation, we observed an increase in the message of these proteins following microcapsule implantation. In the model of wound healing, this time point is associated with fibroblast recruitment and deposition of extracellular matrix proteins. Following implantation of microcapsules into rat epididymal fat pads, we observed an increase of TGF- β_1 message in pericapsular cells that was associated with an increase number of fibroblasts in the pericapsular exudate [57, 61].

Our microcapsules have a molecular weight cut-off of approximately 40 kDa [78]. Some cytokines could easily penetrate the microcapsules membranes. Kulseng has shown that microcapsules of different types were all permeable to IL-1 β (17.5 kDa) but impermeable to TNF- α (51 kDa) [79]. IL-1 β is reported to be cytotoxic and cause functional impairment and lysis of islet cells [45-49]. King has shown that microencapsulation does not protect islets against the detrimental effects of IL-1 β and TNF- α [80]. Indeed, microencapsulated islet activity (insulin release and glucose oxidation) was suppressed after *in vitro* culture with IL-1 β and TNF- α [80]. We have shown that inflammatory cytokine messages are increased *in vivo* after microcapsule implantation. Therefore, it is likely that inflammatory cytokines are released near microencapsulated islets *in vivo* and can reduce encapsulated islet function and viability.

The evaluation of exudate, tissue and cellular responses to different biomaterials, both *in vitro* and *in vivo*, support the hypothesis that monocyte/macrophage activation with subsequent synthesis of regulatory factors such as IL-1 β plays a significant role in determining the host response to biomedical implants [81-84]. We believe that the initial increase in the message of TNF- α , IL-1 β and IL-6 is the result of macrophage activation by the complement system triggered by the implantation procedure and/or the microcapsules.

These results suggest that the implantation procedure produced a temporary peritoneal cellular reaction while microcapsules amplify and prolong this reaction. TNF- α , IL-1 β , IL-6 and TGF- β_1 messages are increased in peritoneal exudate following empty microcapsule implantation. This was consistent with the initiation of acute inflammatory response and the beginning of chronic inflammation associated with ultimate implant

rejection. This study confirms the role of macrophages in the HRM, whereas the role of neutrophils is not clear. Better understanding of the HRM will allow the development of strategies to improve microcapsule biocompatibility and develop a bioartificial endocrine pancreas.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Canadian Diabetes Association and the Juvenile Diabetes Foundation International. Robert Robitaille received a joint student fellowship from the Fond de la Recherche en Santé du Québec and the Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. Karine Desbiens received a student fellowship from the Association Diabète Québec.

REFERENCES

1. Kendall, D.M. and R.P. Robertson, *Pancreas and islet transplantation. Challenges for the twenty-first century*. Endocrinol Metab Clin North Am, 1997. **26**(3): p. 611-30.
2. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
3. Brendel, M., et al., *International islet transplant registry report*. University of Giessen, 1999: p. 1-20.
4. Hering, B.J., et al., *Clinical islet transplantation--registry report, accomplishments in the past and future research needs*. Cell Transplant, 1993. **2**(4): p. 269-82; discussion 283-305.
5. Warnock, G.L., et al., *Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1992. **35**(1): p. 89-95.
6. Ricordi, C., et al., *Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases*. Transplantation, 1992. **53**(2): p. 407-14.
7. Lim, F. and A.M. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 1980. **210**(4472): p. 908-10.
8. Fan, M.Y., et al., *Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets*. Diabetes, 1990. **39**(4): p. 519-22.
9. Sun, Y., et al., *Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1417-22.
10. Soon-Shiong, P., et al., *Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation*. Lancet, 1994. **343**(8903): p. 950-1.
11. Halle, J.P., et al., *Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes*. Transplantation, 1993. **55**(2): p. 350-4.
12. Soon-Shiong, P., et al., *Prevention of CTL and NK cell-mediated cytotoxicity by microencapsulation*. Horm Metab Res Suppl, 1990. **25**: p. 215-9.

13. O'Shea, G.M., M.F. Goosen, and A.M. Sun, *Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane*. Biochim Biophys Acta, 1984. **804**(1): p. 133-6.
14. Wijsman, J., *et al.*, *Histological and immunopathological analysis of recovered encapsulated allogeneic islets from transplanted diabetic BB/W rats*. Transplantation, 1992. **54**(4): p. 588-92.
15. Mazaheri, R., *et al.*, *Transplantation of encapsulated allogeneic islets into diabetic BB/W rats. Effects of immunosuppression*. Transplantation, 1991. **51**(4): p. 750-4.
16. Darquy, S., *et al.*, *Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different diabetic models in mice*. Horm Metab Res Suppl, 1990. **25**: p. 209-13.
17. Weber, C.J., *et al.*, *The role of CD4+ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice*. Transplantation, 1990. **49**(2): p. 396-404.
18. O'Shea, G.M. and A.M. Sun, *Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice*. Diabetes, 1986. **35**(8): p. 943-6.
19. De Vos, P., *et al.*, *Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 893-9.
20. Lum, Z.P., *et al.*, *Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules*. Transplantation, 1992. **53**(6): p. 1180-3.
21. Fritschy, W.M., *et al.*, *Glucose tolerance and plasma insulin response to intravenous glucose infusion and test meal in rats with microencapsulated islet allografts*. Diabetologia, 1991. **34**(8): p. 542-7.
22. Soon-Shiong, P., *et al.*, *Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets*. Transplantation, 1992. **54**(5): p. 769-74.
23. De Vos, P., *et al.*, *Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets*. Diabetologia, 1997. **40**(3): p. 262-70.
24. Fritschy, W.M., *et al.*, *The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats*. Transpl Int, 1994. **7**(4): p. 264-71.
25. Clayton, H.A., R.F. James, and N.J. London, *Islet microencapsulation: a review*. Acta Diabetol, 1993. **30**(4): p. 181-9.

26. Cole, D.R., *et al.*, *Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure*. Diabetologia, 1992. **35**(3): p. 231-7.
27. De Vos, P., *et al.*, *Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 888-93.
28. van Schilfgaarde, R. and P. de Vos, *Aspects of immunoprotection of islets*. Transplant Proc, 1996. **28**(6): p. 3516-7.
29. Kulseng, B., *et al.*, *TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patients after stimulation with alginate and lipopolysaccharide*. Scand J Immunol, 1996. **43**(3): p. 335-40.
30. Otterlei, M., *et al.*, *Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate*. J Immunother, 1991. **10**(4): p. 286-91.
31. Tahri Jouti, M.A., H. Ramdi, and M. Lievremon, *Effect of alginate and calcium on secretion of IL-1 by immobilized Swiss peritoneal macrophages*. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol, 1993. **21**(3): p. 353-8.
32. Jahr, T.G., *et al.*, *Induction of tumor necrosis factor production from monocytes stimulated with mannuronic acid polymers and involvement of lipopolysaccharide-binding protein, CD14, and bactericidal/permeability-increasing factor*. Infect Immun, 1997. **65**(1): p. 89-94.
33. Espevik, T., *et al.*, *The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 255-61.
34. Otterlei, M., *et al.*, *Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor alpha induction*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1917-25.
35. Pueyo, M.E., *et al.*, *In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules*. J Biomater Sci Polym Ed, 1993. **5**(3): p. 197-203.
36. Siebers, U., *et al.*, *Analysis of the cellular reaction towards microencapsulated xenogeneic islets after intraperitoneal transplantation*. J Mol Med, 1999. **77**(1): p. 215-8.
37. Hunt, J.A., P.J. McLaughlin, and B.F. Flanagan, *Techniques to investigate cellular and molecular interactions in the host response to implanted biomaterials*. Biomaterials, 1997. **18**(22): p. 1449-59.
38. Kirkpatrick, C.J., *et al.*, *The cell and molecular biological approach to biomaterial research: a perspective*. J Mater Sci Mater Med, 1997. **8**: p. 131-141.

39. Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami, *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. Science, 1985. **229**(4716): p. 869-71.
40. Wong, G.G. and S.C. Clark, *Multiple actions of interleukin 6 within a cytokine network*. Immunol Today, 1988. **9**(5): p. 137-9.
41. Le, J. and J. Vilcek, *Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities*. Lab Invest, 1987. **56**(3): p. 234-48.
42. Waage, A., A. Halstensen, and T. Espevik, *Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease*. Lancet, 1987. **1**(8529): p. 355-7.
43. Vilcek, J., et al., *Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors*. J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 632-43.
44. Libby, P., et al., *Inducible interleukin-1 gene expression in human vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1986. **78**(6): p. 1432-8.
45. Pukel, C., H. Baquerizo, and A. Rabinovitch, *Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1*. Diabetes, 1988. **37**(1): p. 133-6.
46. Mandrup-Poulsen, T., et al., *Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans*. Diabetologia, 1986. **29**(1): p. 63-7.
47. Bergmann, L., et al., *Cytotoxic action of IL-1 beta against pancreatic islets is mediated via nitric oxide formation and is inhibited by NG-monomethyl-L-arginine*. FEBS Lett, 1992. **299**(1): p. 103-6.
48. Wogensen, L.D., et al., *Functional and morphological effects of interleukin-1 beta on the perfused rat pancreas*. Diabetologia, 1990. **33**(1): p. 15-23.
49. Sandler, S., et al., *Studies on the mechanisms causing inhibition of insulin secretion in rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 beta indicate a perturbation in the mitochondrial function*. Endocrinology, 1989. **124**(3): p. 1492-501.
50. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target*. Annu Rev Med, 1994. **45**: p. 491-503.
51. Mutsaers, S.E., et al., *Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 5-17.

52. Kovacs, E.J. and L.A. DiPietro, *Fibrogenic cytokines and connective tissue production*. *Faseb J*, 1994. **8**(11): p. 854-61.
53. Kovacs, E.J., *Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue*. *Immunol Today*, 1991. **12**(1): p. 17-23.
54. Border, W.A. and N.A. Noble, *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(19): p. 1286-92.
55. Pierce, G.F., *et al.*, *Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair*. *Am J Pathol*, 1992. **140**(6): p. 1375-88.
56. Roberts, A.B. and M.B. Sporn, *The transforming growth factor-betas*, in *Peptide growth factors and their receptors 1. Handbook of Experimental Pharmacology*, A.B. Roberts and M.B. Sporn, Editors. 1990, Springer Verlag: New York. p. 419-472.
57. Robitaille, R., *et al.*, *Time course of transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta(1)) mRNA expression in the host reaction to alginate-poly-L-lysine microcapsules following implantations into rat epididymal fat pads*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **52**(1): p. 18-23.
58. Halle, J.P., *et al.*, *Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses*. *Cell Transplant*, 1994. **3**(5): p. 365-72.
59. Sun, A.M. and G.M. O'Shea, *Microencapsulation of living cells - A long-term delivery system*. *Journal of Controlled Release*, 1985. **2**: p. 137-141.
60. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
61. Robitaille, R., *et al.*, *Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: a novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates*. *J Biomed Mater Res*, 1999. **45**(3): p. 223-30.
62. De Vos, P. and R. Van Schilfgaarde, *Biocompatibility issues*, in *Cell encapsulation technology and therapeutics*, W.M. Kuhlreiber, R.P. Lanza, and W.L. Chick, Editors. 1999, Birkhauser: Boston. p. 63-75.

63. Thu, B., *et al.*, *Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties.* Biomaterials, 1996. **17**(11): p. 1069-79.
64. Leblond, F.A., J. Tessier, and J.P. Halle, *Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress.* Biomaterials, 1996. **17**(21): p. 2097-102.
65. Zekorn, T.D.C. and R.G. Bretzel, *Immunoprotection of islets of Langerhans by microencapsulation in barium alginate beads*, in *Cell encapsulation technology and therapeutics*, W.M. Kuhlreiber, R.P. Lanza, and W.L. Chick, Editors. 1999, Birkhauser: Boston. p. 90-96.
66. Vandenbossche, G.M., *et al.*, *Host reaction against empty alginate-polylysine microcapsules. Influence of preparation procedure.* J Pharm Pharmacol, 1993. **45**(2): p. 115-20.
67. Clayton, H.A., *et al.*, *The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-L-lysine capsules.* J Microencapsul, 1991. **8**(2): p. 221-33.
68. De Vos, P., *et al.*, *Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation.* Int J Artif Organs, 1993. **16**(4): p. 205-12.
69. Spargo, B.J., A.S. Rudolph, and F.M. Rollwagen, *Recruitment of tissue resident cells to hydrogel composites: in vivo response to implant materials.* Biomaterials, 1994. **15**(10): p. 853-8.
70. Falck, P., *Characterization of human neutrophils adherent to organic polymers.* Biomaterials, 1995. **16**(1): p. 61-6.
71. Anderson, J.M. and K.M. Miller, *Biomaterial biocompatibility and the macrophage.* Biomaterials, 1984. **5**(1): p. 5-10.
72. Anderson, J.M., *Inflammatory response to implants.* ASAIO Trans, 1988. **34**(2): p. 101-7.
73. Ziats, N.P., K.M. Miller, and J.M. Anderson, *In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials.* Biomaterials, 1988. **9**(1): p. 5-13.
74. Hsu, B.R., *et al.*, *The rescue effect of 15-deoxyspergualin on intraperitoneal microencapsulated xenoislets.* Cell Transplant, 1999. **8**(3): p. 307-15.
75. Weber, C., *et al.*, *NOD mouse peritoneal cellular response to poly-L-lysine-alginate microencapsulated rat islets.* Transplant Proc, 1994. **26**(3): p. 1116-9.

76. Christenson, L., L. Wahlberg, and P. Aebischer, *Mast cells and tissue reaction to intraperitoneally implanted polymer capsules*. J Biomed Mater Res, 1991. **25**(9): p. 1119-31.
77. Hunt, J.A., et al., *Effect of biomaterial surface charge on the inflammatory response: evaluation of cellular infiltration and TNF alpha production*. J Biomed Mater Res, 1996. **31**(1): p. 139-44.
78. Robitaille, R., et al., *Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography*. J Biomed Mater Res, 2000. **50**(3): p. 420-7.
79. Kulseng, B., et al., *Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane*. Cell Transplant, 1997. **6**(4): p. 387-94.
80. King, A., A. Andersson, and S. Sandler, *Cytokine-induced functional suppression of microencapsulated rat pancreatic islets in vitro*. Transplantation, 2000. **70**(2): p. 380-3.
81. Miller, K.M., V. Rose-Caprara, and J.M. Anderson, *Generation of IL-1-like activity in response to biomedical polymer implants: a comparison of in vitro and in vivo models*. J Biomed Mater Res, 1989. **23**(9): p. 1007-26.
82. Kishida, A., et al., *Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis. I. Study of IL-1 beta mRNA expression*. Biomaterials, 1996. **17**(13): p. 1301-5.
83. Bonfield, T.L. and J.M. Anderson, *Functional versus quantitative comparison of IL-1 beta from monocytes/macrophages on biomedical polymers*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**(9): p. 1195-9.
84. Cardona, M.A., R.L. Simmons, and S.S. Kaplan, *TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(7): p. 851-9.

TABLES

Table 1: Oligonucleotide primers used in semi-quantitative PCR.

Primers	Sequences (Sense and anti-sense)	Annealing temperatures (° C)	[MgCl ₂] (mM)	PCR cycles
GAPDH	5'-GTGATGGGTGTGAACCACGAG-3' 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'	60	1.5	33
TNF- α	5'-GGTCTACTTTGGAGTCATTGCTCT-3' 5'-GATCCACTCAGGCATCGACATTCTG-3'	60	1.5	37
IL-1 β	5'-AGAAGCTGTGGCAGCTACCTATGT-3' 5'-CTCTGCTTGAGAGGTGCTGATG-3'	55	3	37
IL-6	5'-GAAATGAGAAAAGAGTTGTGC-3' 5'-GGAAGTTGGGGTAGGAAGGAC-3'	55	2	35
TGF- β_1	5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC-3' 5'-CACGATCATGTTGGACAACTGCTCC-3'	55	1.5	33

Table 2: Pericapsular reaction following microcapsule implantation

Post-implantation time (hours)	n	% recovered capsules	% recovered capsules without reaction	% overall capsules with reaction *
3	6	65.9 \pm 4.8	94.7 \pm 2.0	37.4 \pm 5.2
17	6	79.4 \pm 5.6	88.9 \pm 3.2	29.4 \pm 5.8
48	6	63.1 \pm 5.3	94.9 \pm 0.8	40.0 \pm 5.5
96	6	53.6 \pm 9.6	86.6 \pm 4.5	51.7 \pm 9.8
168	6	46.8 \pm 7.1	94.6 \pm 1.8	55.4 \pm 7.1

* Unrecovered microcapsules were combined with the ones showing a pericapsular cellular reaction because it is assumed that unrecovered microcapsules are presenting a strong pericapsular reaction.

FIGURES

Figure 1A

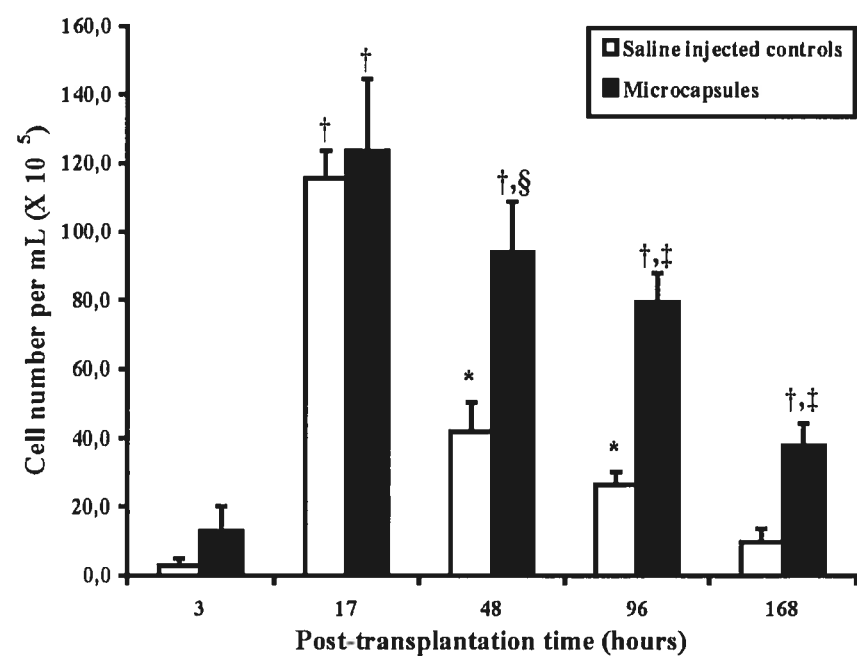


Figure 1B

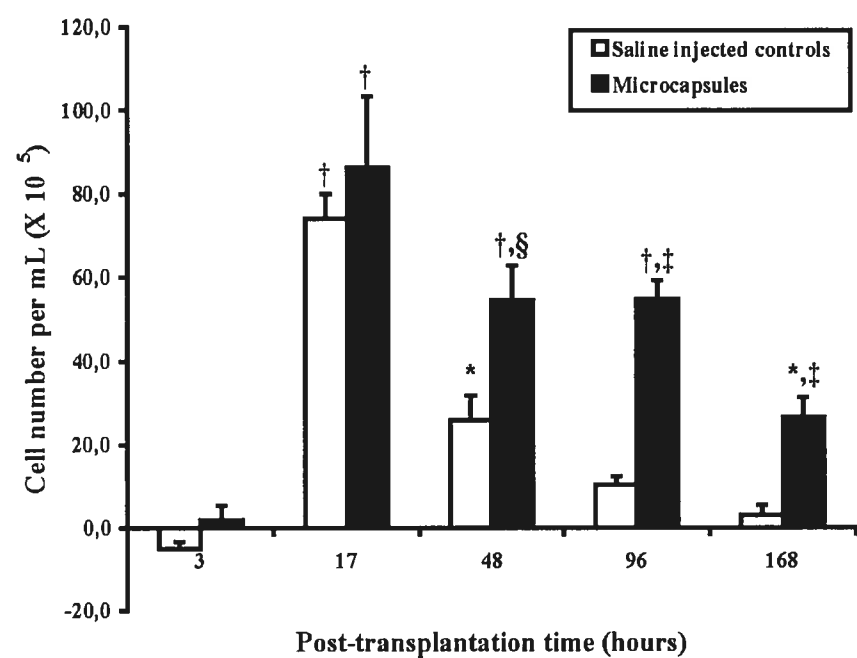


Figure 1C

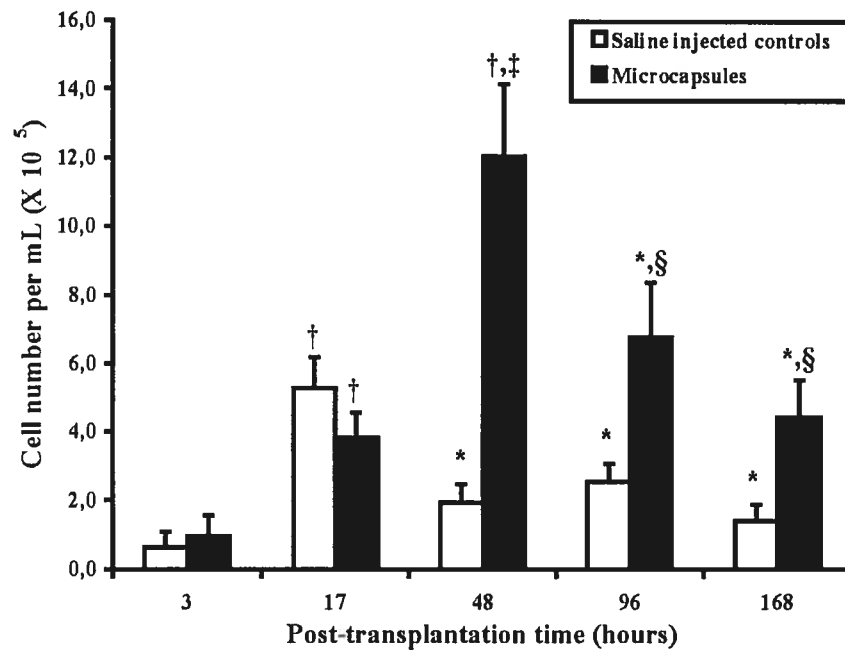


Figure 1D

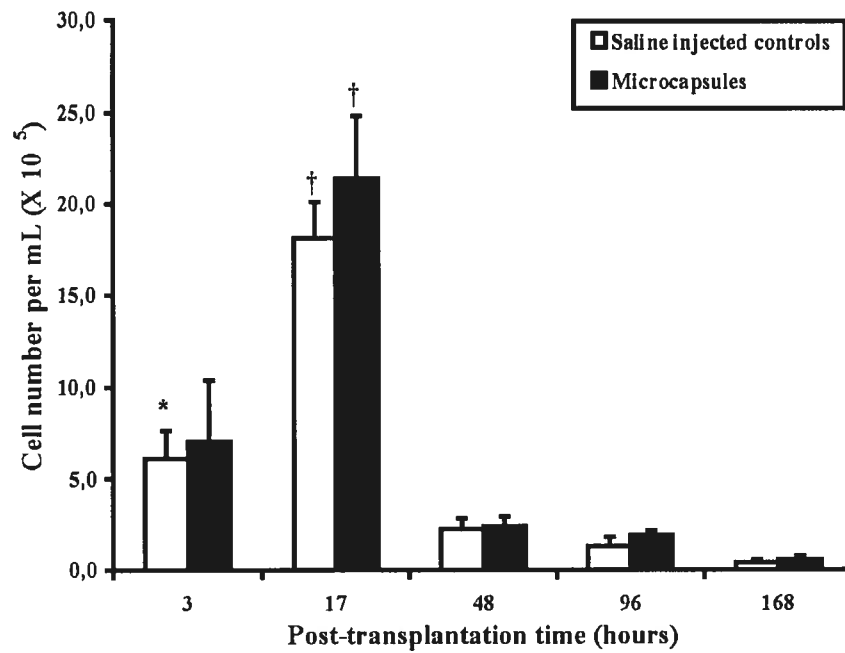


Figure 1E

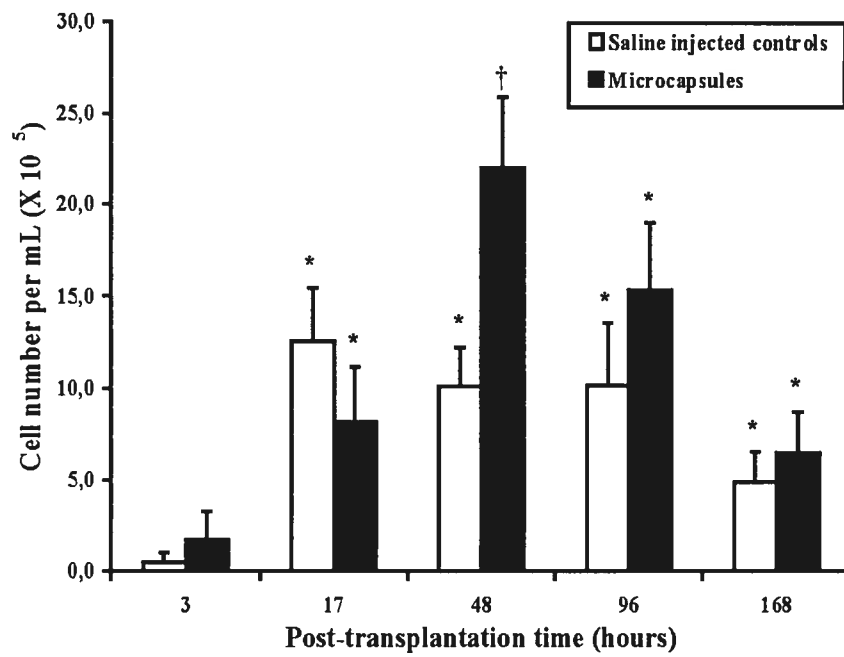


Figure 1F

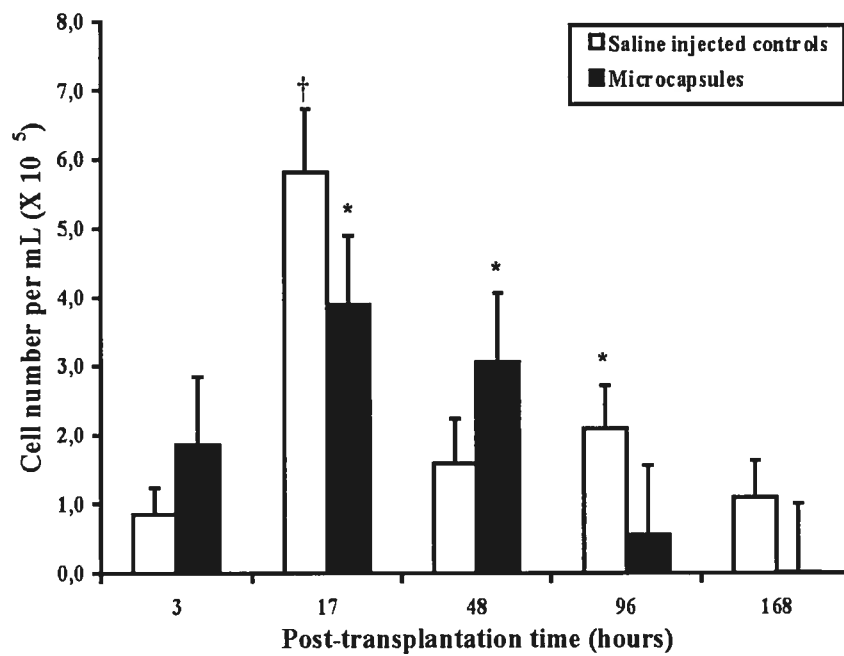


Figure 2A

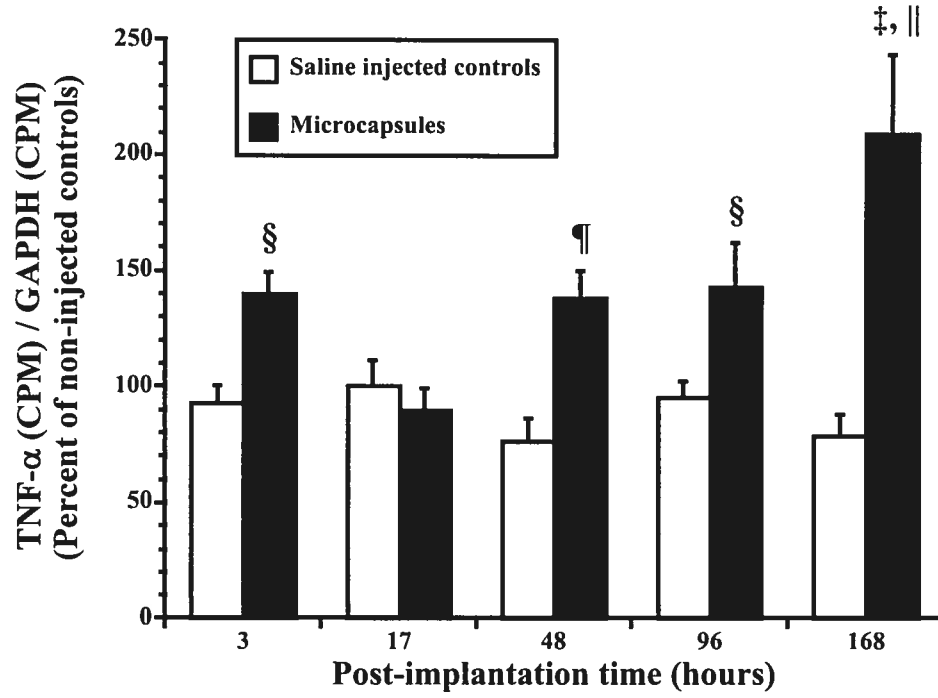


Figure 2B

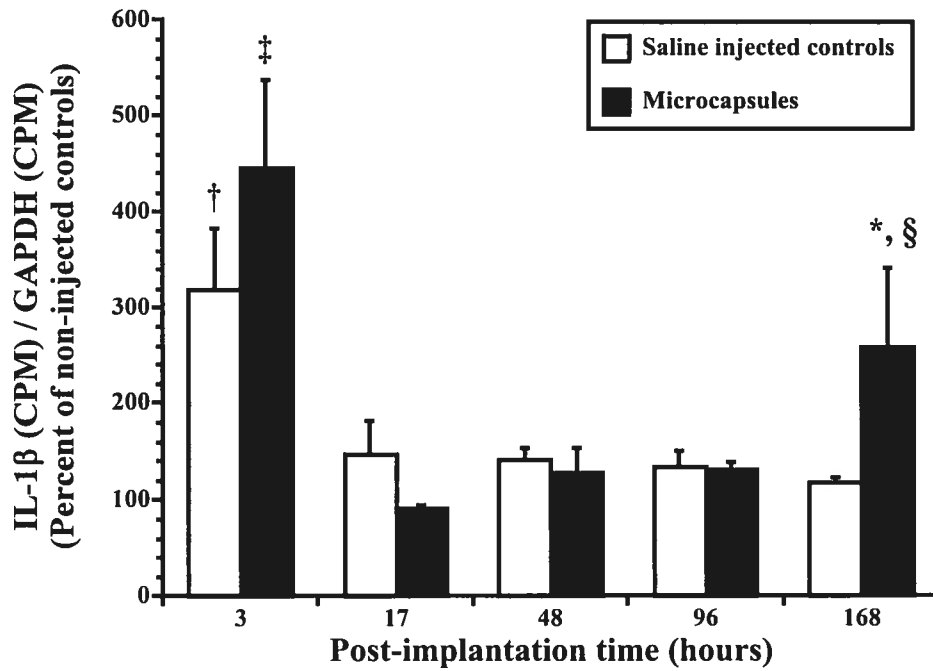


Figure 2C

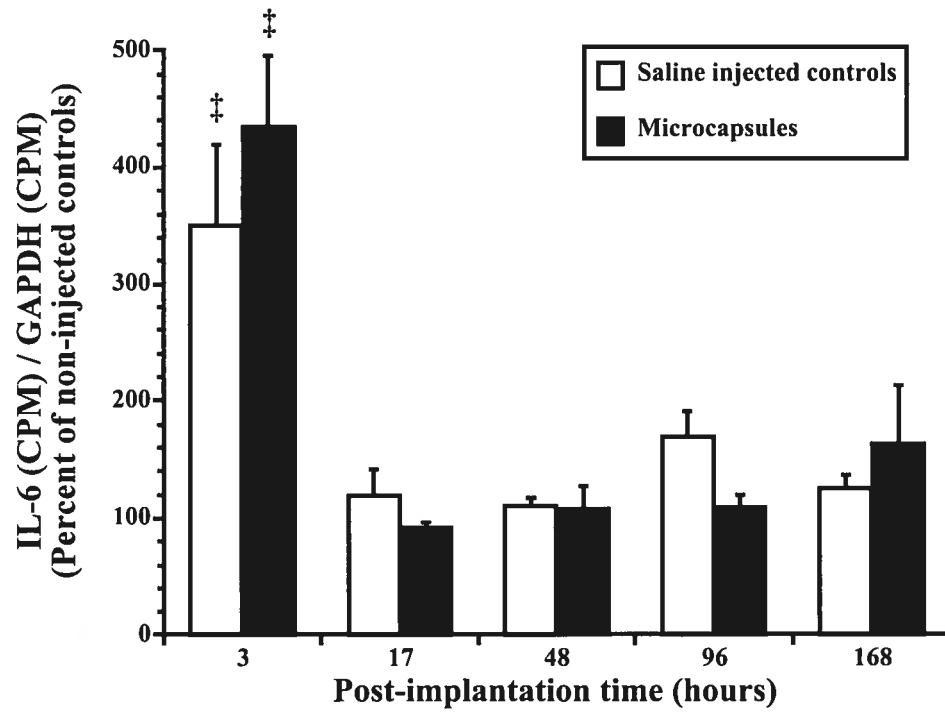
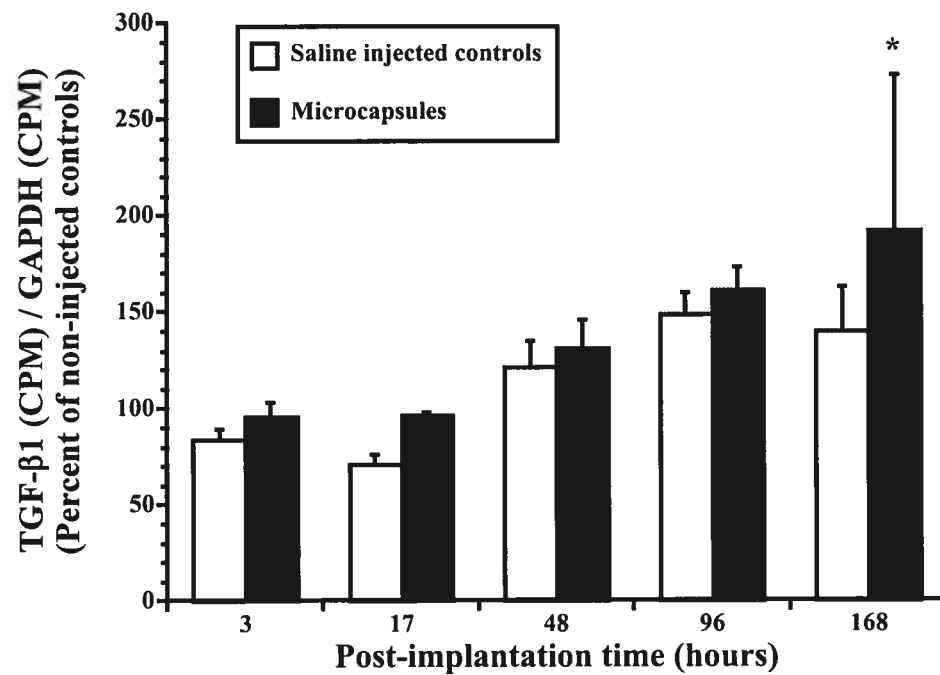


Figure 2D



LEGEND FOR FIGURES

Figure 1: Peritoneal cellular reaction profile in response to microcapsule implantation or physiological saline injection. The results are expressed as cell number per mL of peritoneal fluid. The average cell number from non-injected controls was subtracted from experimental values. **A)** Total peritoneal cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $26.2 \pm 4.7 \times 10^5$ cells per mL. * $p < 0.01$, † $p < 0.001$ vs. non-injected controls. § $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$ vs. saline injected controls. **B)** Peritoneal macrophage cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $19.9 \pm 3.7 \times 10^5$ macrophages per mL. * $p < 0.01$, † $p < 0.001$ vs. non-injected controls. § $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$ vs. saline injected controls. **C)** Peritoneal lymphocyte cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $1.0 \pm 0.2 \times 10^5$ lymphocytes per mL. * $p < 0.05$, † $p < 0.001$ vs. non-injected controls. § $p < 0.05$, ‡ $p < 0.001$ vs. saline injected controls. **D)** Peritoneal neutrophil cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $0.1 \pm 0.0 \times 10^5$ neutrophils per mL. * $p < 0.01$, † $p < 0.0001$ vs. non-injected controls. **E)** Peritoneal eosinophil cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $3.5 \pm 1.0 \times 10^5$ eosinophils per mL. * $p < 0.05$, † $p < 0.001$ vs. non-injected controls. **F)** Peritoneal mastocyte cell count after microcapsule or saline injection. The average cell number for non-injected controls was $1.6 \pm 0.4 \times 10^5$ mastocytes per mL. * $p < 0.05$, † $p < 0.001$ vs. non-injected controls.

Figure 2: Relative cytokine gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. The results of semi-quantitative RT-PCR are expressed as the ratio of cytokine amplification products (in cpm) on the GAPDH amplification products (in cpm). The data is expressed as a percentage of non-injected controls (background value). PCR experiments were performed in triplicate. **A)** Relative TNF- α gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. § $p < 0.05$, ¶ $p < 0.01$, || $p < 0.0001$ vs. saline injected controls. ‡ $p < 0.0001$ vs. non-injected controls. **B)** Relative IL-1 β gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. * $p < 0.05$, † $p < 0.005$, ‡ $p < 0.0001$ vs. non-injected controls. § $p < 0.05$ vs. saline injected

controls. **C)** Relative IL-6 gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. [†] $p < 0.0001$ vs. non-injected controls. **D)** Relative TGF- β_1 gene expression after microcapsule implantation or physiological saline injection. * $p < 0.05$ vs. non-injected controls.

D.3. Étude 3. Studies on small (<350 µm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography

Robert Robitaille, François A. Leblond, Yvan Bourgeois, Nathalie Henley, Martin Loignon et Jean-Pierre Hallé

J Biomed Mater Res, 2000. **50**(3): p. 420-7.

Rôle des coauteurs :

Yvan Bourgeois et Nathalie Henley ont participé à la collecte des données et à la révision de l'article. François A. Leblond et Martin Loignon ont participé à la conception du projet et à la révision de l'article. Jean-Pierre Hallé a participé à la conception du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'ai fait une contribution majeure en participant activement à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'étais le premier responsable des résultats de recherche donnant lieu à cet article.

STUDIES ON SMALL (<350 μ M) ALGINATE-POLY-L-LYSINE MICROCAPSULES.
V. DETERMINATION OF CARBOHYDRATE AND PROTEIN PERMEATION
THROUGH MICROCAPSULES BY REVERSE-SIZE EXCLUSION
CHROMATOGRAPHY

Robert Robitaille, François A. Leblond, Yvan Bourgeois, Nathalie Henley,
Martin Loignon, Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415 boulevard de
l'Assomption, Montréal, Québec, H1T 2M4, CANADA

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

Running Title: Microcapsule molecular weight cut-off.

To whom correspondence should be addressed:

Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Canada

Fax: (514) 252-3430



ABSTRACT

Membrane molecular weight (MW) cut-off is a critical factor for immunoprotection of transplanted microencapsulated cells as well as for graft survival. Our goal was to study dextran and protein permeation through small ($<350\text{ }\mu\text{m}$ in diameter) alginate-poly-L-lysine microcapsules made with an electrostatic system. Microcapsules were packed into a column, and gel-sieving chromatography was performed with proteins and dextrans of known MW. The objectives of this study were **(1)** to validate this approach for the assessment of the MW cut-off of $<350\text{ }\mu\text{m}$ -in-diameter microcapsules and **(2)** to evaluate the effect on MW cut-off of changes in experimental conditions. Elution profiles of proteins suggest that the MW cut-off of our small microcapsules lies between 14,500 and 44,000 Da whereas dextrans $\geq 19,000\text{ Da}$ were excluded. The increase in poly-L-lysine (PLL) concentration from 0.02 to 0.08% reduced the MW cut-off. Increasing the PLL MW from 11.6 to 69.6 kDa induced no change in the MW cut-off. The results also show that the method can be used to discriminate between adsorption and absorption and that insulin diffuses freely across the microcapsule membrane. This method will be useful in establishing the ideal MW cut-off, in optimizing microcapsule characteristics, and in performing routine quality controls.

KEY WORDS: microencapsulation; permeation; molecular weight cut-off; size exclusion chromatography; proteins

INTRODUCTION

Transplantation of islets of Langerhans is a promising approach for the treatment of type 1 diabetes mellitus.¹⁻³ Immunoisolation of islets in semipermeable alginate-poly-L-lysine microcapsules has been proposed to prevent their immune destruction.⁴⁻⁶ Reversal of hyperglycemia in rodents,⁷ dogs,⁸ monkeys,⁹ and in one diabetic human patient,¹⁰ using transplantation of microencapsulated islets, has been reported.

Microcapsule size is an important parameter in achieving successful transplantation. Smaller microcapsules (<350 μm in diameter) offer many advantages over standard microcapsules (>700 μm in diameter), such as reduced total implant volume, better insulin kinetics,¹¹ improved cell oxygenation,¹² greater biocompatibility,¹³ better resistance to mechanical degradation,¹⁴ and potential access to new implantation sites.¹⁵ Microcapsules of <350 μm in diameter have been produced using an electrostatic pulse system,^{7,16} as opposed to the usual air-driven extrusion system (air-jet) and the more recent modified air-jet system,¹⁷ which produce microcapsules of ≥ 700 and 500 μm , respectively. Considering the three-dimensional configuration of microcapsules, 700 and 500 μm -in-diameter microcapsules are, respectively, 980 and 290% larger in volume than 350- μm microcapsules. The dynamics governing the formation of standard versus smaller microcapsules are different.¹⁶ This implies that conclusions of studies on standard microcapsule characteristics, including permeability, cannot be applied systematically to smaller microcapsules. Thus we have undertaken systematic studies of smaller microcapsules made with the electrostatic pulse system, using and validating new methods for the characterization of microcapsules.^{13,15,16,18-21}

Microcapsule molecular weight (MW) cut-off is a critical factor for immunoprotection as well as for graft survival and function. Theoretically, microcapsule membranes must be designed to allow free diffusion of glucose, insulin, and nutrients while protecting encapsulated cells from attacks by cells and molecules of the immune system. Different approaches have been used to evaluate the exclusion limit of the standard (>700 μm diameter) microcapsule membrane. Some methods are based on encapsulation of soluble markers and measurement in the supernatant of the released marker concentration.^{18,22,23} Marker washout during the encapsulation procedure and interference

by the marker in membrane formation limit these methods. Alternatively, cell encapsulation can be used to evaluate the permeability.^{24,25} Following incubation of encapsulated cells in a cell lysing agent or a secretagogue, the release of intracellular components or secretion products can be measured in the supernatant. However, these cells release a limited number of markers, and the cell lysing agents or secretagogues may adsorb to the membrane. The most widely used method consists of soaking capsules in a dextran solution and measuring the concentration variations of this soluble marker in the supernatant and/or inside the capsules.²⁵⁻³⁰ The problems with these methods are (1) a low sensitivity and (2) the fact that marker adsorption on the membrane surface may be confused with absorption into microcapsules.

Brissova et al. have studied the permeability of standard size ($>700\ \mu\text{m}$) alginate-poly-L-lysine microcapsules,³¹ using the principle of size exclusion chromatography in a reverse manner. Usually in size exclusion chromatography, columns made of beads with a known pore size are used to determine the unknown molecular weight of the molecules under study. In contrast, to study microcapsule permeability, the reverse principle has been applied. Columns have been mounted using microcapsules with unknown membrane permeability. Dextrans of different known molecular weights have been run on the column, and their elution profile has allowed differentiation between excluded and diffusing molecules for a specific batch of microcapsules. Unlike other methods, this sensitive technique allows the study of several MW markers on the same microcapsule batch and, as demonstrated in the present article, can differentiate absorption from adsorption.

Brissova et al., and others, have used only dextrans, that is, carbohydrate markers, to characterize microcapsule permeability.^{28,31} For the evaluation of actual pore size, dextrans have the advantage of a neutral charge and a more homogenous three-dimensional configuration. However, this is not the case with proteins that are modified by the milieu chemical characteristics (pH, ionic charges, etc.). Caution should be exercised when extrapolating the conclusions of such studies to the functional protein permeation, which is the major concern for immunoprotection. The hydrophobicity, amphiphilic character, and zwitterionic nature of proteins give them a more globular structure and a different behavior than neutral polysaccharides, such as dextrans. It therefore is difficult to draw conclusions with regard to protein permeation only on the basis of results obtained with dextrans. The

current investigation was undertaken to evaluate the permeation of a wide range of dextrans and proteins through small ($<350\text{ }\mu\text{m}$ in diameter) microcapsules made with the electrostatic pulse system. The specific objectives of the study were (1) to validate the reverse-size exclusion chromatography method for the study of dextran as well as of protein permeation through microcapsules; (2) to determine the MW cutoff of small microcapsules, routinely made in our laboratory using the electrostatic pulse system; (3) to demonstrate the ability of this technique to discriminate between absorption and adsorption of specific molecules; (4) to determine whether insulin adsorbs onto microcapsule components or freely diffuses in and out of microcapsules; and (5) to evaluate the effects on membrane MW cut-off of changes in the parameters governing microcapsule production.

MATERIALS AND METHODS

Microcapsule preparation

Alginate beads were produced by extruding 1.8% sodium alginate (Kelco, Clark, New Jersey) into a 100-mM calcium lactate solution. The droplets were generated with the use of an electrostatic pulse generator,^{7,16} allowing the production of calcium alginate beads of approximately 250 μm . Microcapsules were prepared according to the procedure described by Fritschy et al.³² Briefly, alginate beads successively were soaked in decreasing concentrations of calcium lactate (from 100 to 25 mM). Subsequently the beads were incubated in a 0.05% poly-L-lysine (Sigma, St. Louis, Missouri) solution (MW 23.8 kDa) to produce the membrane. After washes in HBSS without Mg^{2+} and Ca^{2+} or saline, the capsules were incubated in a dilute (0.18%) alginate solution. The microcapsule diameter was $<350 \mu\text{m}$.

Gel-sieving column preparation

Microcapsules (7 mL) suspended in saline at room temperature were placed in a 15/0.7 cm (length/diameter) column, and saline was run at room temperature for 2 h at a flow rate of 320 mL/min. Once the column was packed, it was adjusted to have a final volume of 5 mL by removing the excess fluid and microcapsules. Saline was run for an additional 2 h at a flow rate of 250 mL/min to stabilize the microcapsule gel before starting the experiments.

Determination of microcapsule MW cut-off by gel-sieving column

A small volume (100 mL) of a marker (1 mg/mL in saline, 0.9%) was applied on top of the microcapsule column and was eluted with 0.9% saline (as with a gel sieving column). Fractions of 0.2 mL were collected. The elution profile of a solute is reported here as a diagram with the solute concentration (y-axis) as a function of the volume of eluent (x-axis). Before use, the column must be standardized with a marker of known permeation. For measurement of the dead volume (V_0), an FITC-labeled dextran (Sigma, St. Louis, Missouri) with a MW of 2×10^6 Da was used. The V_0 corresponds to the peak (maximum) of the elution profile of dextran 2×10^6 Da. On the other hand, glucose (180.2 Da) was used as a marker for freely diffusing molecules (V_t). The V_t corresponds to the peak of the elution profile of glucose. Both profiles were recorded and used as references for the

column. From the elution profile of each solute, a chromatographic partition coefficient (K_{sec}) was calculated as

$$K_{\text{sec}} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

where V_e is the solute retention volume (corresponding to the peak of the elution profile of the solute), V_o is the column void volume, and V_t is the total permeable volume of the column. Table I depicts MW, viscosity radius (R_η), and pI of different markers used in the present study to determine membrane permeability. The molecular weights of carbohydrate and protein markers ranged from 180.2 to 2×10^6 Da and 5700 Da to 140,000 Da, respectively. Protein markers were fluorescein-labeled with a fluorescein labeling kit (Roche Diagnostics, Laval, Québec). Fluorescent markers were read on a LS-5 fluorescence spectrophotometer (Perkin –Elmer Canada, Montréal, Québec; excitation $\lambda = 490$ nm; emission $\lambda = 520$ nm) while glucose fractions were monitored on a glucose analyzer (YSI Inc., Yellow Springs, Ohio). The OD of unmarked proteins was monitored at 280 nm or at their specific OD wavelength. Finally, unlabeled insulin mixed with ^{125}I -insulin in a 40,000:1 ratio was run on a column, and fractions were monitored on a gamma counter. After each solute, the column was regenerated with 500 mM of saline solution. As shown in the results, some markers presented a biphasic elution profile. In order to eliminate the possibility that some markers included two molecular populations, samples with biphasic elution profiles were purified by G-75 Sephadex column chromatography or denatured by heat treatment at $60^\circ\text{C} + 5\%$ SDS or diluted and reapplied on the same regenerated microcapsule column and on a new column. In addition, the elution fractions corresponding to each peak were separated and reapplied on the same regenerated microcapsule column as well as on a new one. For each marker, duplicate experiments were performed, and the variability between elution profiles was minimal without affecting the estimation of the V_e .

Effect of poly-L-lysine concentration on microcapsule MW cut-off

Microcapsules were prepared with different concentrations of poly-L-lysine, 23.8 kDa (Table II). Dextran and proteins were applied on columns mounted with each of the microcapsule preparations and K_{sec} values were calculated.

Effect of poly-L-lysine MW on microcapsule MW cut-off

Microcapsules were prepared with poly-L-lysine of different MW (Table III). Dextran and proteins were eluted on columns made with each of these preparations and K_{sec} values were calculated.

RESULTS

Our first concern was to test the capacity of the microcapsule (diameter $<350\ \mu\text{m}$) column to discriminate between diffusing and nondiffusing markers. For the measurement of the dead volume ($V_o = 2.1\ \text{mL}$), we used an FITC-labeled dextran of $2 \times 10^6\ \text{Da}$ (classical excluded marker). Glucose was used as a marker for freely diffusing molecules due to its small size, neutral nature, and its physiologic interest ($V_t = 4.3\ \text{mL}$). The elution profile of these two markers illustrates the capacity of the microcapsule column to distinguish between diffusing and excluded markers (Fig. 1). These markers also were used to determine the optimal conditions for the assay (column geometry, eluent flow rate, application, collection sample size, etc.). The column size selected was the smallest one that allowed a clear discriminating capacity between a diffusing (glucose) and an excluded (dextran $2 \times 10^6\ \text{Da}$) marker.

The elution volume of dextrans of MW 4400 and 9400 Da was similar to the elution volume of glucose. Therefore microcapsules are permeable to these markers. Dextrans with a MW of 19,000 Da have the same elution volume as dextran $2 \times 10^6\ \text{Da}$ and do not penetrate the microcapsule membrane. Therefore the MW cut-off to dextrans is between 9400 and 19,000 Da.

We also used protein markers to measure the MW cut-off of our small microcapsules (Table I). Lactate dehydrogenase (140,000 Da), bovine serum albumin (66,000 Da), and ovalbumin (44,000 Da) were totally excluded (Fig. 2). Phospholipase A2 (14,500 Da) presented an elution profile similar to glucose, indicating that it diffuses freely into microcapsules (Fig. 2). These results suggest that the MW cut-off to proteins lies between 14,500 and 44,000 Da.

Some markers presented a biphasic profile (Fig. 3). The major elution peak of carboxypeptidase A (35,250 Da) was similar to that of glucose, with a small peak at V_o , indicating a relatively good penetration but some interference. In contrast, soybean trypsin inhibitor (20,100 Da) and superoxide dismutase (31,200 Da) presented a major peak similar to that of dextran $2 \times 10^6\ \text{Da}$, with a long tail at the V_t . Sample contamination, aggregation, or column overcharge were ruled out since purified, denatured, and diluted samples all

presented the same profiles. In addition, when elution fractions from each single peak were reapplied on the same column, similar biphasic profiles were observed, indicating that these results are not due to the presence of different molecule subpopulations (Fig. 3).

The ability of this gel-sieving method to distinguish between adsorption and absorption of proteins also was investigated. As seen in Figure 4, only 0 and 3.8% of cytochrome C were washed out of the microcapsule column after an elution volume equivalent to one gel volume and two times the total gel volume, respectively. Cytochrome C eluted mostly at a volume corresponding to 3.6 times the total gel volume. This noticeable shift to the right of the elution profile is typical of protein adsorption to the microcapsule column and probably is due to ionic interactions. In contrast, the elution profile of insulin was similar to that of freely diffusing phospholipase A2 (Fig. 4). The percentage of insulin that was washed out of the column after one gel volume and two times the total gel volume was 82 and 100%, respectively. It thus appears that insulin does not adsorb on the microcapsule membrane and freely can penetrate the microcapsule.

As expected, increasing poly-L-lysine concentration reduced the MW cut-off of small alginate poly-L-lysine microcapsules (Table II). Diffusing markers have a K_{sec} near 1 and nondiffusing markers have a K_{sec} near 0. Only glucose ($K_{\text{sec}} = 1.0$) penetrated the 0.08% poly-L-lysine microcapsules whereas molecules as small as dextran 4400 Da and insulin (5700 Da) did not. Microcapsules made with 0.05% poly-L-lysine were permeable to dextran 4400 Da ($K_{\text{sec}} = 1.0$), carboxypeptidase A (MW 35,250 Da; $K_{\text{sec}} = 1.0$), and insulin ($K_{\text{sec}} = 1.0$), but they were impermeable to dextran 19,000 Da, dextran 2×10^6 Da, and bovine serum albumin (66,000 Da). Finally, dextrans 4400 Da ($K_{\text{sec}} = 0.9$) and 19,000 Da ($K_{\text{sec}} = 0.7$) and carboxypeptidase A ($K_{\text{sec}} = 1.0$) diffused into 0.02% poly-L-lysine microcapsules that excluded dextran 2×10^6 Da and bovine serum albumin (66,000 Da).

The permeation of dextran 4400 and 9400 Da remained constant when the MW of poly-L-lysine increased from 11.6 kDa to 69.6 kDa (Table III). A slight decrease in the permeation of dextran 4400 and 9400 Da was observed when the MW of poly-L-lysine was raised to 126 kDa (Table III). The permeation of all dextrans was greatly reduced when the poly-L-lysine 390 kDa was used (Table III). When protein markers were used, the increase

in MW of poly-L-lysine from 11.6 kDa to 126 kDa induced no change in marker permeation. However, when the MW of poly-L-lysine was raised to 390 kDa, the permeation of carboxypeptidase A was greatly reduced while phospholipase A2 remained able to penetrate the microcapsule membrane (Table III).

DISCUSSION

Development of methods to evaluate microcapsules is essential for the progress of microencapsulation technologies. However, each technical modification introduced to improve microcapsule characteristics such as size, strength, or biocompatibility may deteriorate other important microcapsule functions, such as permeability. In addition, when clinical applications are considered, evaluative methods will be required to insure quality control. In the present study, reverse-size exclusion chromatography was used to characterize the carbohydrate and protein permeation through $<350\text{-}\mu\text{m}$ microcapsules made with a high-voltage electrostatic pulse system. Considering that the volume of a spheroid has a cubic relation with its diameter, the volumes of these microcapsules are 8- to 27-fold smaller than those of standard microcapsules (diameter: $700\text{--}1200\text{ }\mu\text{m}$). Such a dramatic volume difference leads to major differences in the dynamics of microcapsule formation, particularly for the coating of alginate beads with poly-L-lysine, which is the major determinant of the microcapsule MW cut-off. Methods for producing alginate beads, reactant volumes, and reaction times are different. Therefore the characteristics and function of these smaller microcapsules, including their MW cut-off, must be re-evaluated.

It was possible to find conditions that would allow the use of a small column that could discriminate clearly between molecules that can diffuse freely into microcapsules and molecules that are excluded. It is obvious that a larger column would improve the resolution, but the preparation of the large amount of microcapsules needed to fill such a column would be time consuming and expensive. The method is simple, rapid, and versatile. Once the sample is applied onto the column, the elution profile is monitored by spectrophotometry or, in the case of FITC-labeled markers, by spectrofluorometry, which facilitates the automation of the test. Radiolabeled markers also can be used, for example insulin, which was used in the present study. The same column can be reused for a virtually unlimited number of markers. The only limit is the capacity to monitor the marker. Therefore it is possible to test the permeation of any molecules of interest in a specific system. Microcapsules are evaluated in bulk, which is more representative of the whole capsule population compared with techniques that use only a few capsules. Many markers may be evaluated concomitantly (by duplicating the column) or in queue since the time for a complete run is less than 1 h. No sophisticated equipment is required.

The size and MW distribution of the solute can affect the shape of the elution profile and give rise to a nonsymmetric profile with a long tail.³¹ In addition, the nonhomogeneity of the MW cut-off of the microcapsules and adsorption of solutes on the microcapsules also can modify the shape of the elution profile. The nonhomogeneous MW cut-off of the microcapsules is responsible for the biphasic profile observed with solutes that have a MW near the MW cut-off of the microcapsules. Adsorption and desorption of an excluded solute do not give a biphasic profile but rather a delayed profile, as observed with cytochrome C. The interactions leading to adsorption are stronger than the interactions of a diffusing solute with the solid phase. Since the elution volume of an adsorbed excluded marker is higher than the total volume of the column, it is unlikely that adsorption of an excluded solute can make it appear to be diffusing. The present study demonstrated that this method discriminates between adsorption to microcapsule components and free diffusion through microcapsule membrane. This eliminates an important potentially confounding factor. Indeed, alginate-poly-L-lysine microcapsules have a high concentration of charged groups at their surface. Therefore it is important to know if molecules with an alkaline or acid pI will bind to the capsule components or will diffuse freely. Using the capacity of the method to discriminate adsorption from absorption, it was shown that insulin diffuses freely into microcapsules and therefore does not adsorb to microcapsule components, which has been a concern with microencapsulated islets of Langerhans.

Studies using dextran as markers clearly showed that the MW cut-off to carbohydrates of our small microcapsules is between 9400 and 19,000 Da. The results confirmed that findings obtained using carbohydrate markers may not be applied automatically to protein permeation, which is a more complex matter. For instance, carboxypeptidase A (35,200 Da) diffuses into microcapsules whereas dextran 19,000 Da is excluded. However, when the viscosity radius (R_η) rather than the MW is considered, the differences between dextrans and proteins are not so important (Table I). But, even among some proteins there are discrepancies. Soybean trypsin inhibitor (20,100 Da) and superoxide dismutase (31,200 Da) are almost completely excluded in spite of a smaller MW than that of carboxypeptidase A. These data suggest that for proteins between 14,500 and 44,000 Da, permeation is affected by factors other than MW, such as three-dimensional configuration and ionic charges. The behavior of a specific protein with a molecular weight

within this range may be determined by performing the test using this specific protein as a marker.

The use of a panel of dextrans and proteins allowed the study of the effect of modifications of experimental conditions on membrane MW cut-off. Increasing poly-L-lysine concentration resulted in a decrease of the MW cut-off. This is in agreement with previous reports.^{26,29,30} Using poly-L-lysine 0.08%, it was possible to produce microcapsules that excluded dextran 4400 Da and insulin (5700 Da). This is much smaller than what is required for immunoprotection and, in the case of microencapsulated islets of Langerhans, would be too small to allow effective insulin release. But it illustrates the possibility of controlling and decreasing microcapsule MW cut-off. Inversely, increasing microcapsule MW cut-off is feasible by decreasing poly-L-lysine concentration to 0.02%. However, further studies are required to evaluate the effect of such modifications on microcapsule resistance to mechanical degradation.

To clarify the effect of the poly-L-lysine MW on <350- μ m-in-diameter microcapsule MW cut-off, we used a combination of dextrans and proteins. Modulations of poly-L-lysine MW from 11.6 to 69.6 kDa induced no changes in membrane MW cut-off. Poly-L-lysine MW had to be increased to 126 kDa to decrease dextran permeation and to 390 kDa to reduce the diffusion of proteins. These findings are in agreement with previous data obtained with standard >800 μ m microcapsules.^{25,29,30} Brissova et al.³¹ have found that poly-L-lysine MW does not affect the permeability of standard microcapsules. Since they presented no data that address this particular issue, it is possible that they have studied only poly-L-lysine under 69.9 kDa, which are usually used to encapsulate cells. It is noteworthy that small microcapsules made with poly-L-lysine MW >69.9 kDa are not adequate for transplantation because of morphologic imperfections.

The results showed that our small (<350 μ m in diameter) microcapsules have a MW cut-off between 9400 and 19,000 Da with dextrans and between 14,500 and 44,000 Da with proteins. This could be modified if required, as shown in the present study, by modulating the experimental conditions. The ideal MW cut-off is not known. It may be hypothesized that for immunoprotection, smaller is better, and for supplying nutriments and eliminating waste from cellular metabolism, larger is better. However, preventing contact with immune

cells may be the only requirement for preventing tissue rejection since it has been shown that islets embedded in an agarose hydrophilic gel membrane with a cut-off higher than the MW of IgG immunoglobulins can survive when transplanted into diabetic animals.^{33,34} Nevertheless, better immunoprotection is certainly provided if antibodies (IgG = MW 146,000 Da) are excluded. The advantage of preventing the penetration of cytokines (MW 15,000 to 35,000 Da) is not clear since most published successfully encapsulated islet transplantations have been done using microcapsules with a MW cut-off of >50,000 Da (when this parameter is mentioned).³⁵⁻³⁷ On the other hand, what is the minimal MW cut-off that will allow adequate islet nutrition and function? There are even fewer data that address this question. Obviously, oxygen, glucose, and insulin have to diffuse freely, and they do so, as shown in the results of the present study. Other molecules as large as transferrin (MW 75,000 Da) may be required for long-term survival. This important issue requires further study. The method described in the present report will be useful for studies designed to determine which is the ideal MW cut-off to insure adequate immunoprotection as well as long-term islet survival and function. This method is an important tool to optimize microcapsule characteristics and eventually will be used routinely for quality control.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. E. Drobetsky for reviewing the manuscript. Contract grant sponsors: Canadian Diabetes Association, Medical Research Council of Canada (grant number: MA-14435), Juvenile Diabetes Foundation International, Association Diabète Québec (student fellowship for RR), Fonds de la Recherche en Santé du Québec and the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (joint student fellowship for RR).

REFERENCES

1. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng Y, Rodriguez Rilo HL, Alejandro R, Shapiro R, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 1992;53:407–414.
2. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, Rabinovitch A, Rajotte RV. Long-term follow-up after transplantation of insulinproducing pancreatic islets into patients with type I (insulindependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:89–95.
3. Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, Nakleh RE, Sutherland DER, Robertson RP. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *N Engl J Med* 1992;327:220–226.
4. Chang TMS. Semipermeable microcapsules. *Science* 1964;146: 524–526.
5. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980;210:908–910.
6. Hallé J-P, Bourassa S, Leblond FA, Chevalier S, Beaudry M, Chapdelaine A, Cousineau S, Saintonge J, Yale JF. Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Transplantation* 1993;55:350–354.
7. Lum Z-P, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM. Xenografts of rat islets into diabetic mice. *Transplantation* 1992;53:1180–1183.
8. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Heintz R, Yao Q, Yao Z, Zheng T, Merideth N, Skjak-Braek G, Espevik T, Smidsrod O, Sandford P. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5843– 5847.
9. Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 1996;98:1417–1422.
10. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, Murphy M, Moloney MK, Schmehl M, Harris M, Mendez R, Mendez R, Sandford PA. Insulin independence in a type I diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994;343:950–951.
11. Chicheportiche D, Reach G. In vitro kinetics of insulin release by microencapsulated rat islets: Effect of the size of the microcapsules. *Diabetologia* 1988;31:54–57.

12. Schrezenmeir J, Gero L, Laue C, Kirchgessner J, Muller A, Huls A, Passmann R, Hahn HJ, Kunz L, Mueller-Klieser W, Altman JJ. The role of oxygen supply in islet transplantation. *Transplant Proc* 1992;24:2925–2929.
13. Robitaille R, Pariseau J-F, Leblond FA, Lamoureux M, Lepage Y, Hallé J-P. Studies on small (<350 μ m) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules. *J Biomed Mater Res* 1999;44:116–120.
14. Ma X, Vacek I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: The relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Artif Cells, Blood Subs, Immob Biotech* 1994;22:43–69.
15. Leblond FA, Simard G, Henley N, Rocheleau B, Huet P-M, Hallé J-P. Studies on smaller (~315 μ m) microcapsules. IV. Feasibility and safety of intraportal implantations of small alginate poly-L-lysine microcapsules. *Cell Transplant* 1999;8:327–337.
16. Hallé J-P, Leblond FA, Pariseau J-F, Jutras P, Brabant M-J, Lepage Y. Studies on small (<300 μ m) microcapsules. II. Parameters governing the production of alginate bead by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 1994;3:365–372.
17. Wolters GHJ, Fritschy WM, van Schilfgaarde R. A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. *J Appl Biomater* 1992;3:281–286.
18. Hallé J-P, Leblond FA, Landry D, Fournier A, Chevalier S. Studies of 300 μ m microcapsules. I. Use of Arginine esterase release by microencapsulated prostatic cells as a measure of membrane permeability. *Transplant Proc* 1992;24:2930–2932.
19. Pariseau J-F, Leblond FA, Harel F, Lepage Y, Hallé J-P. The rat epididymal fat pad as an implantation site for the study of microcapsule biocompatibility. Validation of the method. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1331–1335.
20. Leblond FA, Tessier J, Hallé J-P. Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress. *Biomaterials* 1996;17:2097–2102.
21. Robitaille R, Leblond FA, Henley N, Prud'homme GJ, Drobetsky E, Hallé J-P. Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: A novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates. *J Biomed Mater Res* 1999;45:223–230.
22. Leung YF, O'Shea GM, Goosen MFA, Sun AM. Microencapsulation of crystalline insulin or islets of Langerhans : An insulin diffusion study. *Artif Organs* 1983;7:208–212.

23. Sawhney AS, Hubbell JA. Poly(ethylene oxide)-graft-poly(L-lysine) copolymers to enhance the biocompatibility of poly(L-lysine)- alginate microcapsule membranes. *Biomaterials* 1992; 13:863–870.
24. Darquy S, Reach G. Immunoisolation of pancreatic beta cells by microencapsulation: An in vitro study. *Diabetologia* 1985; 28:776–780.
25. Shimi SM, Newman EL, Hopwood D, Cushieri A. Semipermeable microcapsules for cell culture: Ultra-structural characterization. *J Microencapsulation* 1991;8:307–316.
26. Goosen MFA, King GA, McKnight CA, Marcotte N. Animal cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular weight cut-off. *J Membrane Sci* 1987;41:323–343.
27. Tatarkiewicz K. New membrane for cell encapsulation. *Artif Organs* 1988;12:446–448.
28. Coromili V, Chang TMS. Polydisperse dextran as a diffusing test solute to study the membrane permeability of alginate polylysine microcapsules. *Biomater Artif Cells, Immob Biotechnol* 1993;21:427–444.
29. Vandenbossche GMR, Van Oostveldt P, Remon J-P. A fluorescence method for the determination of the molecular weight cut-off of alginate-polylysine microcapsules. *J Pharmaceut Pharmacol* 1991;43:275–277.
30. Vandenbossche GMR, Van Oostveldt P, Demeester J, Remon J-P. The molecular weight cut-off of microcapsules is determined by the reaction between alginate and polylysine. *Biotech Bioeng* 1993;42:381–386.
31. Brissova M, Petro M, Lacik I, Powers AC, Wang T. Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Anal Biochem* 1996;242:104–111.
32. Fritschy WM, Wolters GHJ, van Schilfgaarde R. Effect of alginate –polylysine–alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets. *Diabetes* 1991;40:37–43.
33. Iwata H, Kobayashi K, Takagi T, Oka T, Yang H, Amemiya H, Tsuji T, Ito F. Feasibility of agarose microbeads with xenogeneic islets as a bioartificial pancreas. *J Biomed Mater Res* 1994; 28:1003–1111.
34. Iwata H, Morikawa N, Fujii T, Takagi T, Samejima T, Ikada Y. Does immunoisolation need to prevent the passage of antibodies and complements. *Transplant Proc* 1995;27:3224–3226.

35. Zekorn T, Siebers U, Bretzel R, Renardy GM, Planck H, Zschocke P, Federlin K. Protection of islets of Langerhans from interleukin-1 toxicity by artificial membranes. *Transplantation* 1990;50:391–394.
36. Cole DR, Waterfall M, McIntyre M, Baird JD. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: A possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* 1992;35:231–237.
37. Tai IT, Vacek I, Sun A. The alginate–polylysine–alginate membrane: Evidence of a protective effect on microencapsulated islets of Langerhans following exposure to cytokines. *Xenotransplantation* 1995;2:37–45.

TABLES

Table I: Molecular weight markers used to determine microcapsule MW cut-off.

Samples	MW (Da)	R η (nm)	Elution profiles*	pI
<u>Carbohydrate markers</u>				
Dextran [†]	2,000,000	34.2	E	-
Dextran [†]	19,000	3.4	E	-
Dextran [†]	9400	2.4	D	-
Dextran [†]	4400	1.7	D	-
Glucose	180.2	0.3	D	-
<u>Protein markers</u>				
Lactate dehydrogenase	140,000	4.5	E	8.4
Bovine serum albumin	66,000	3.4	E	5.5
Ovalbumin	44,000	2.9	E	4.6
Carboxypeptidase A	35,250	2.7	B	6.0
Superoxide dismutase	31,200	2.5	B	7.0
Soybean trypsin inhibitor	20,100	2.2	B	4.5
Phospholipase A ₂	14,500	1.9	D	7.9
Cytochrome C	11,700	1.8	A	9.6
Insulin [‡]	5700	1.3	D	5.0

[†] FITC-labeled; [‡] ¹²⁵I-labeled; * 0.05 % poly-L-lysine (23.8 kDa) microcapsules;

R η : viscosity radius; A: adsorption; B: biphasic; E: exclusion; D: diffusion

Table II: Effect of poly-L-lysine concentration on microcapsule MW cut-off.

Samples	K_{sec}		
	0.02 % PLL	0.05 % PLL	0.08 % PLL
Dextran 2×10^6 Da	0.0	0.0	0.0
Dextran 19,000 Da	0.7	0.0	0.0
Dextran 4400 Da	0.9	1.0	0.1
Glucose	-	1.0	1.0
Insulin	-	1.0	0.1
Carboxypeptidase A	1.0	1.0	-
Bovine serum albumin	0.0	0.0	-

Table III: Effect of poly-L-lysine MW on microcapsule MW cut-off.

Samples	K_{sec}				
	PLL 11.6	PLL 23.8	PLL 69.6	PLL 126	PLL 390
	kDa	kDa	kDa	kDa	kDa
Dextran 2×10^6 Da	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dextran 19 000 Da	-	0.0	-	-	0.0
Dextran 9400 Da	0.8	0.8	0.8	0.5	-
Dextran 4400 Da	0.9	0.8	0.7	0.6	0.1
Carboxypeptidase A	1.0	0.8	0.9	0.8	0.1
Superoxyde dismutase	0.9	0.8	0.9	0.8	-
Soybean trypsin inhibitor	0.7	1.0	1.0	1.0	-
Phospholipase A ₂	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9

FIGURES

Figure 1

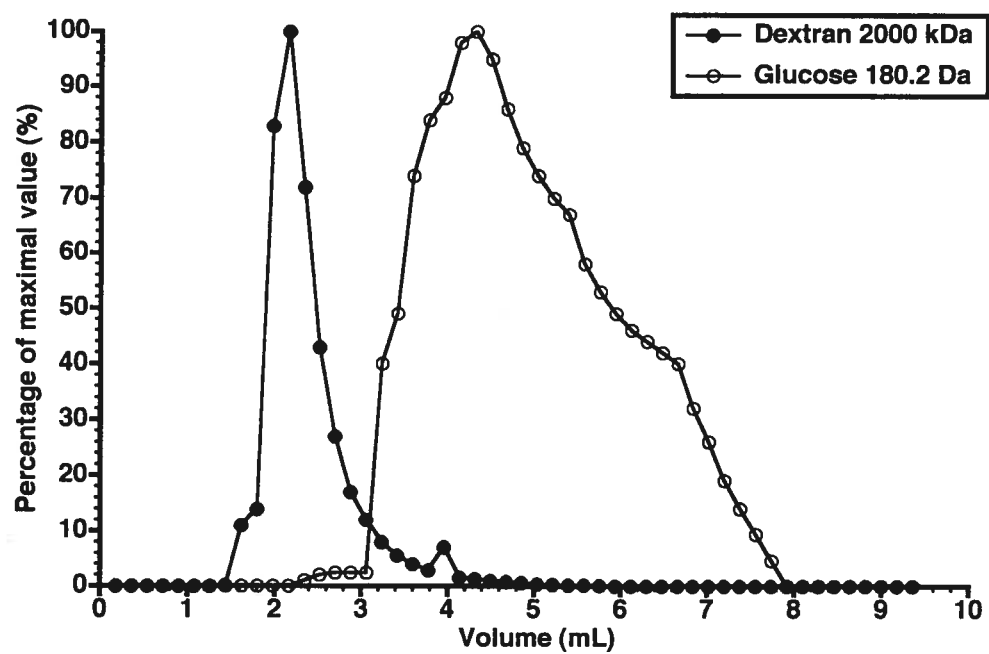


Figure 2

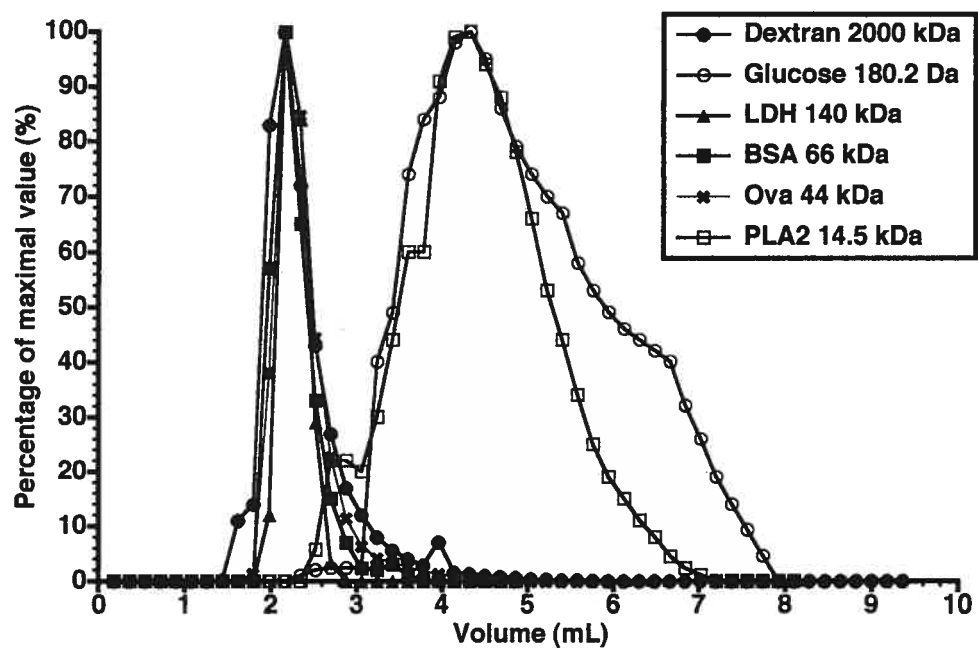


Figure 3

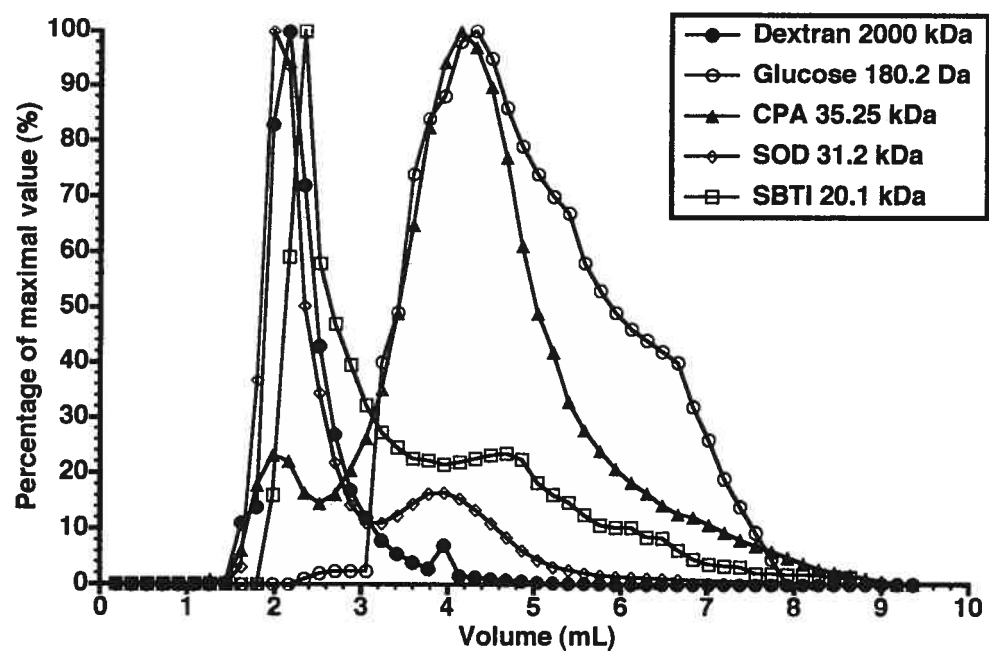
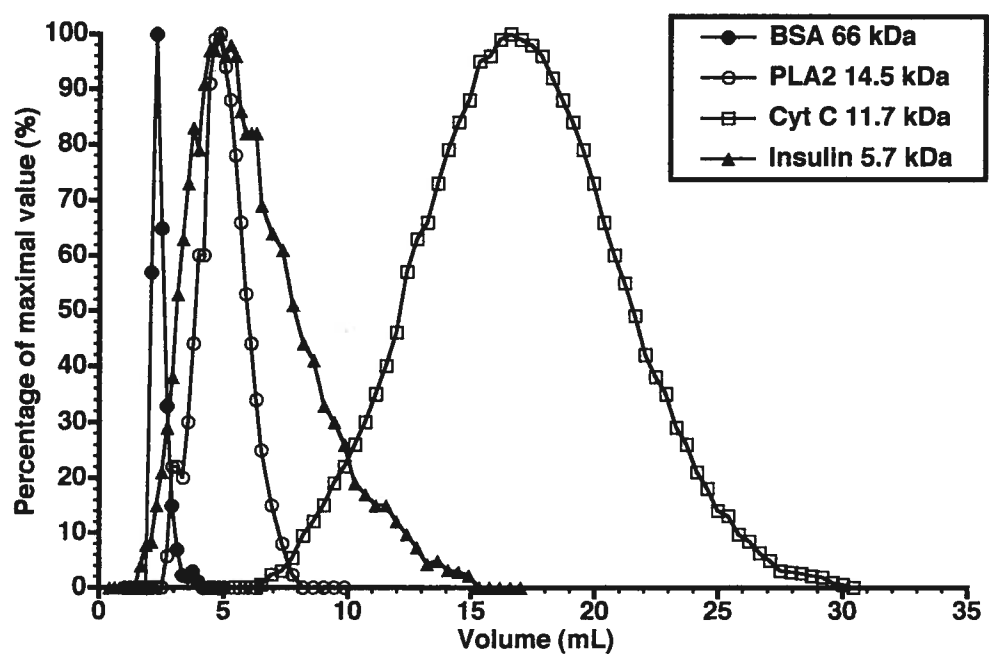


Figure 4



LEGEND FOR FIGURES

Figure 1. Size exclusion parameters of the alginate-poly-L-lysine microcapsule column. Small microcapsules were made with 0.05% poly-L-lysine (MW 23.8 kDa). The elution profile of dextran 2×10^6 Da (classical exclusion marker) was used to determine the dead volume (V_o) of the microcapsule column ($V_o = 2.1$ mL). The elution profile of glucose (MW 180.2 Da), a freely diffusing molecule, was used to determine the total permeable volume (V_t) of the microcapsule column ($V_t = 4.3$ mL).

Figure 2. Protein permeation through alginate-poly-L-lysine microcapsules. Small microcapsules were made with 0.05% poly-L-lysine (MW 23.8 kDa). The elution profiles of proteins that cannot penetrate microcapsule membranes are identical to the elution profile of dextran 2×10^6 Da (closed symbols). The solute retention volume (V_e) of lactate dehydrogenase, bovine serum albumin, and ovalbumin is identical to V_o ($V_e = V_o = 2.1$ mL). The elution profile of phospholipase A2 is similar to the elution profile of freely diffusing glucose (open symbols). Phospholipase A2 $V_e = V_t = 4.3$ mL.

Figure 3. Permeation through alginate-poly-L-lysine microcapsules of proteins with particular chromatographic behavior. Small microcapsules were made with 0.05% poly-L-lysine (MW 23.8 kDa). Proteins with a biphasic elution profile are shown. The major elution peak of carboxypeptidase A is similar to that of glucose while the major elution peaks of superoxide dismutase and soybean trypsin inhibitor are similar to that of dextran 2×10^6 Da.

Figure 4. Difference between adsorption and permeation. Small microcapsules were made with 0.05% poly-L-lysine (MW 23.8 kDa). The cytochrome C retention volume (V_e) is 15.4 mL, which is 3.6 time higher than the total permeable volume of the microcapsule column ($V_t = 4.3$ mL). This profile is typical of proteins that are adsorbed on microcapsule components. The elution profile of insulin is similar to that of phospholipase A2, which can freely penetrate microcapsule membranes.

D.4. Étude 4. Effect of membrane molecular weight cut-off (MWCO) on microencapsulated islets survival

Karine Desbiens, Robert Robitaille, Julie Dusseault, Martin Ménard, Nathalie Henley et Jean-Pierre Hallé

Soumis à « Transplantation »

Rôle des coauteurs :

Karine Desbiens a participé à la conception du projet, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la révision de l'article. Julie Dusseault, Martin Ménard et Nathalie Henley ont participé à la collecte des données, l'analyse des résultats ainsi qu'à la révision de l'article scientifique. Jean-Pierre Hallé a participé à la conception du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'ai fait une contribution majeure et égale à celle de Karine Desbiens en participant activement à la conception du projet, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'étais le coresponsable des travaux et des résultats de recherche donnant lieu à cet article.

EFFECT OF MEMBRANE MOLECULAR WEIGHT CUT-OFF (MWCO) ON MICROENCAPSULATED ISLET SURVIVAL

Karine Desbiens, M.Sc.^{†,‡}, Robert Robitaille, M.Sc.^{†,‡}, Julie Dusseault, B.Sc.[†],
Martin Ménard, M.Sc.[†], Nathalie Henley, M.Sc.[†] and Jean-Pierre Hallé, MD.^{†,*}

[‡]These authors contributed equally to this manuscript.

[†]Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec,
H1T 2M4, Canada

Running title: Effect of MWCO on encapsulated islet survival.

* To whom correspondence should be addressed:

Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de Recherche Guy-Bernier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Canada

Fax: (514) 252-3430

e-mail: hallejp@videotron.ca

ABSTRACT

Several fundamental issues, such as membrane permeability, must be addressed before considering clinical application of microencapsulated islet transplantation. The effect of membrane MWCO on encapsulated islet survival is unknown. We evaluated this effect both *in vitro* and in minimal mass transplantations into diabetic mice. Four types of microcapsules having 3 different MWCO were studied: low MWCO (Ca^{2+} alginate-0.08 % PLL), medium MWCO (Ca^{2+} alginate-0.01 % PLL and Ba^{2+} alginate-PLL-free) and high MWCO (Ca^{2+} alginate-PLL-free). No differences in the incidence and duration of normoglycemia were observed after transplantation of islet encapsulated in medium MWCO PLL free versus high MWCO PLL-free microcapsules. *In vitro* studies showed no differences in islet central necrosis between the different types of capsules. Islets encapsulated in 0.08 % PLL, but not in 0.01 % PLL, microcapsules presented low *in vitro* survival due to cell death at the periphery of islets, whereas both 0.08 % and 0.01 % PLL decreased *in vivo* islet survival compared to PLL-free microcapsules. These results suggest that, in the range studied, the MWCO has no effect on islet survival, PLL 0.08 % has a direct toxicity on islets embedded in alginate and that 0.08 % and 0.01 % PLL trigger an *in vivo* host reaction against microcapsules.

KEY WORDS: Permeability, Pancreatic Islets Transplantation, Diabetes Mellitus, Microencapsulation.

INTRODUCTION

The recent success obtained by groups using the Edmonton protocol have renewed optimism and interest in clinical application of islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes (1-3). This treatment is, however, restricted to a small proportion of diabetic patients due to the low availability of human pancreas and the side effects of the strict, high-dose immunosuppressive treatment required. Immuno-isolation of islets in semipermeable microcapsules has been proposed as a method to prevent the use of immunosuppressive agents and increase the availability of islet transplantation to a larger range of patients.

Despite successful pre-clinical studies in rodents (4-6), dogs (7, 8) and monkeys (9), clinical application of encapsulated islet transplantation remains elusive(10). Before considering clinical trials, several fundamentals issues have to be resolved. These include: 1- the control of the physicochemical characteristics of microcapsules (size, morphology, resistance to mechanical and chemical stress, membrane permeability), 2- the identification of factors involved in host reaction against microcapsules and 3- identification of factors involved in encapsulated islet survival.

Microcapsule membrane selective permeability is the basic concept of immuno-isolation methodologies. In principle, the membrane should prevent cell to cell contact between the transplant and host immune cells, and permeation of harmful molecules such as antibodies. It is not clear if there are advantages in blocking smaller molecules such as cytokines and free radicals. The latter have such a short half-life that they are unlikely to reach islets embedded in alginate beads. Microcapsule membranes should, nonetheless, allow the free diffusion of nutrients and of cell metabolic waste to insure islet survival. Membrane permeability is, thus, a critical issue is the development of a bio-artificial endocrine pancreas. We (11-13) and others (14-17) have developed methods to assess microcapsule molecular weight cut-off (MWCO). The effect of membrane MWCO on islet cell survival is, however, unknown and the ideal MWCO has not been determined.

We hypothesized that a larger MWCO could allow a better diffusion of essential nutrients and release of metabolic waste, thus promoting islet survival. The objective of the present work was to investigate the effect of the MWCO on islet cell survival. This study

did not address the role of the MWCO on cell immunoprotection. The research strategy was relatively simple: **1-** design microcapsules with low (< 30 kDa proteins), medium (\pm 50 kDa proteins) and high (> 80 kDa proteins) MWCO, and **2-** evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the survival of islets encapsulated in each type of microcapsule. Close attention had to be paid to certain aspects of experimental design and to the interpretation of results; specifically the possibility that the conditions used to modulate the MWCO could affect islet cell survival by mechanisms other than the modification of membrane permeability.

The combined results of *in vivo* and *in vitro* experiments suggests that, in the MWCO range studied, MWCO does not affect islet survival, and that poly-L-lysine (PLL), at high (0.08 %) concentration, is directly toxic for islets encapsulated in alginate. PLL, at both low (0.01 %) and high (0.08 %) concentrations, triggers a host anti-microcapsule reaction. PLL-free Ba²⁺ alginate microcapsules provided the best conditions for islet survival. This is supported by recent findings by Duvivier-Khali et al. (18) who reported long-term islet survival after allotransplantations of similarly microencapsulated islets into NOD mice.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250-400 g body weight; Charles River, St-Jean, QC, Canada) were used for islet isolation. Male B6.CB17-*Prkdc*^{scid}/SzJ mice (15—20 g body weight; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were used as transplant recipients. This immuno-incompetent model was chosen to study islet survival without the confounding effect of an immune reaction against islet grafts. Protocols were reviewed by the animal care committee of the Guy-Bernier Research Centre of the Maisonneuve Hospital and stated to conform to the ethical guidelines of the Canadian Council for Animal Care. These guidelines were observed throughout the study.

Microcapsule polymers

Guluronic (G) acid-rich sodium alginate (LVG; 73 % G; FMC Biopolymer, Philadelphia, PA) was used to produce microcapsules. Poly-L-lysine (PLL) was used to form semipermeable membranes (MW 29.3 kDa; Sigma Chemical Co., St-Louis, MO).

Polymer purification

The alginate was purified according to Klock's procedure (19). In addition, the following modifications proposed by Prokop were introduced: sodium alginate was initially extracted with CHCl₃ before solubilization and activated charcoal treatment (20). The charcoal treatment was repeated twice. The highly purified alginate was sterilized by 0.22 µm filtration and stored at 4 °C prior microcapsule fabrication. All purification steps were performed under endotoxin-free conditions.

Microencapsulation procedure

Alginate beads were produced by extruding 1.5 % sodium alginate through a 22 G needle into 100 mM calcium-lactate solution or 10 mM BaCl₂. Droplets of approximately 250 µm-diameter were formed using an electrostatic impulsion generator(21). Some of the calcium alginate beads were incubated 5 min in 0.01 or 0.08 % PLL to form semipermeable membranes. Microcapsules were then washed in 0.9 % NaCl buffered solution prior to incubation in dilute (1:10) sodium alginate solution for 5 min. Microcapsule

diameter was approximately 350 μm . All microencapsulation steps were performed under endotoxin-free conditions.

Evaluation of membrane MWCO

Evaluation of microcapsule MWCO was performed as previously described (11). Briefly, microcapsules, suspended in saline solution, were placed into a chromatographic column (length/diameter: 15/0.7 cm). A continuous flow rate of saline (320 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 2 hours) was applied to pack the column. Finally, the column was adjusted to a final volume of 5 mL by removing excess fluid and microcapsules. Saline was run for an additional 2 hours at a flow rate of 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ to stabilize the microcapsule gel. FITC-dextran (2×10^6 Da) was used to measure the column dead or void volume (V_o) and glucose was used to determine the column total volume (V_t). Markers of different MW were sequentially run on the column. FITC-dextran and proteins of different MW were used (Tables I and II). Protein markers were fluorescein-labeled with a fluorescein labeling kit (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Fluorescent markers were recovered and read on a spectrofluorimeter (excitation at $\lambda = 490$ nm, emission $\lambda = 520$ nm; Perkin Elmer Ltd., Mississauga, ON, Canada). Glucose was monitored on a glucose analyzer (YSI Inc., Yellow Springs, OH). After each solute, the column was regenerated with 500 mM NaCl solution. For each marker, a partition chromatographic coefficient (K_{sec}) was calculated using the formula: $K_{\text{sec}} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, where V_e is the marker retention volume (corresponding to the peak of the elution profile of the marker). Freely permeable markers have a K_{sec} value near 1. Excluded markers have a K_{sec} value of 0.

Isolation and encapsulation of islets of Langerhans

Islets were isolated using collagenase digestion (Type V, 7.5 mg/mL; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada), purified by centrifugation on Ficoll gradient (Mediatech Inc., Herndon, VA) and further purified by handpicking under inverted light microscope as previously described (22). Islets were cultured overnight in CMRL-1066 (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS) and with 1 % penicilline-streptomycine-glutamine 100X solution (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) in humidified air atmosphere containing 5 % CO_2 . Islets were then washed twice with serum-free HBSS and once with buffered 0.9 % NaCl solution. Then, the islets were suspended in 1.5 % sodium alginate and this

suspension was used to produce alginate beads and microcapsules as described above. For *in vitro* experiments, microencapsulated islets were cultured in CMRL-1066 supplemented with 10 % FCS and with 1 % penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution at 37 °C in humidified air atmosphere containing 5 % CO₂ for up to 56 days. Culture media were changed every second day. For transplantation experiments, microencapsulated islets were cultured overnight in UltraCULTURE medium (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD) supplemented with 1 % penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution at 37 °C in humidified air atmosphere containing 5 % CO₂, and transplanted within 24 hours after encapsulation.

Evaluation of microencapsulated islet viability

Aliquots of 150 islets per experimental condition were studied under an inverted microscope and the islet equivalent number was determined (23). The number of encapsulated islets with central necrosis was evaluated and expressed as the percentage of the total islet equivalent number as previously described (24). Islet diameter (μm) and the diameter (μm) of the area of necrosis were determined using a calibrated scale mounted onto the eyepiece of the microscope. Dual staining fluorescence microscopy was used, as previously described, to evaluate islet cell viability (25, 26). In brief, microencapsulated islets were stained with propidium iodide (PI; 0.5 μg/mL; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada), and acridine orange (AO; 2.4 ng/mL; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Each encapsulated islet was graded: grade 4 islet with less than 10 dead cells, grade 3 islet with more than half of living cells, grade 2 islet with approximately 50 % of dead cells, grade 1 islets with more than 50 % of dead cells and grade 0 islets with less than 10 viable cells. From this classification, a viability index (VI) was calculated as follow:
$$VI = [4(\# \text{ of islets of grade 4}) + 3(\# \text{ of grade 3}) + 2(\# \text{ of grade 2}) + (\# \text{ of grade 1})] / \text{total \# of islets from grade 0 to 4.}$$

Microencapsulated islet transplantation

Diabetes was induced by intraperitoneal injection of STZ (185 mg/kg body weight in sodium citrate buffer, pH 4.5; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Blood glucose of all mice rose above 20 mM within 2 days of STZ injection. Daily subcutaneous ultralente insulin injections were used to maintain mice alive (Humulin U®, 2U/day/mouse, Eli Lilly, Toronto, ON, Canada). Diabetic mice (blood glucose >20 mM for 2 successive

days) were used as recipients for microencapsulated islet transplantations 14 days following STZ injection. Microencapsulated rat islets were transplanted via a 16 G catheter into the peritoneal cavity of diabetic mice anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, 50 mg/kg body weight; MTC Pharmaceutical, Cambridge, ON, Canada). Using a minimal mass model, 500 microencapsulated rat islet equivalents were transplanted into the peritoneum of STZ-induced diabetic mice. The last insulin injection was given at the time of transplantation to minimize the hyperglycemic stress to which islets would be submitted during the first hours post transplantation. Recipient mice had free access to water and food (Mouse colony chow 5018; Agribrands Purina, ON, Canada). Blood glucose levels in samples obtained from mouse-tail veins were measured (Glucometer Elite, Bayer Inc., Toronto, ON, Canada) every day during the first week post-transplantation and then at least once a week for the remainder of the study. Mice were considered normoglycemic when glucose levels were < 11 mM on two consecutive days.

Statistical analysis

All *in vitro* experiments were performed three times and the results were expressed as mean \pm S.E.M. The differences between experimental groups were investigated using ANOVA and unpaired Student's *t*-test with *p* values less than 0.05 considered significant. The differences between experimental groups within a category were analyzed by Chi-squared test with *p* values less than 0.05 considered significant.

RESULTS

In vitro studies

Production of microcapsules with three different MWCO

Our first objective was to produce three types of microcapsules with membranes of high (> 80 kDa proteins), medium (± 50 kDa proteins) and low (< 30 kDa proteins) MWCO. In preliminary experiments (data not shown), we tested several combinations of microencapsulation parameters known to affect the MWCO. These parameters included PLL concentration and PLL reaction time, to produce microcapsules of predetermined MWCO with good resistance to mechanical degradation. The results of this extensive screening are summarized in Table I. Carbohydrate markers (dextrans) of known MW were used to determine the MWCO of the selected microcapsules. Ca^{2+} -alginate beads coated with 0.08 % PLL [henceforth designated low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules] and Ca^{2+} -alginate beads coated with 0.01 % PLL [henceforth designated medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules] were found to be impermeable to dextrans with MW > 9.4 and > 19.6 kDa respectively (Tables I and III). It was noted that PLL concentrations < 0.01 % yielded irregular and fragile microcapsules. PLL was, therefore, omitted in the production of microcapsules of high MWCO. Ca^{2+} -alginate beads (henceforth designated high MWCO (PLL-free) microcapsules) are not permeable to dextrans with MWs > 71.2 kDa (Tables I and III). Different protein markers of known MWs were used to further characterize the MWCO of the selected microcapsules. Low MWCO (0.08 % PLL), medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules are permeable to proteins with MWs ≤ 29 , 44, 160 kDa, respectively (Tables II and III). A fourth type of microcapsules (Ba^{2+} -alginate beads) was not permeable to dextrans with MWs > 19.6 kDa nor to proteins with MWs > 35.3 kDa (Tables I, II and III). Ba^{2+} -alginate beads have a MWCO similar to the Ca^{2+} alginate beads coated with 0.01 % PLL and are henceforth designated as medium MWCO (PLL-free) microcapsules.

Islet morphology

From 2 to 56 days post-isolation, examination of fresh islets under inverted microscope showed that most islets were regularly shaped with a well-defined, smooth appearance and occasional irregular borders. Between 20 and 40 % of the encapsulated islet

population showed signs of very dark tissue located in the center of the islets with borders sharply demarcated from the surrounding islet tissue (Figure 1A). This central area of necrosis was confirmed by routine histology showing signs of very dark tissue located in the center of the islets with sharply demarcated borders (data not shown). There was no significant difference in the percentage of necrotic islets between the types of microcapsules made with Ca^{2+} , demonstrating that MWCO had no effect on islet necrosis (Figure 1A). A tendency to have fewer necrotic islets was, however, observed in the medium MWCO (PLL-free) group compared to the high MWCO (PLL-free) group (significant at 28 days; Figure 1B). The presence of necrosis was associated with islet size, with the area of necrosis being greatest in islets larger than 100 μm (Figures 2A and B). There was a decrease with time in the size of necrotic islets (from ± 170 to ± 100 μm during the first 21 days; Figures 2A and B) and size of the necrotic area (from ± 80 to ± 40 μm during the first 14 days; Figures 2C and D), regardless of microcapsule type. This phenomenon was not observed with non-necrotic islets (Figures 2E and F). Microcapsule MWCO, regardless of the type of microcapsule, had no significant effect on the size of necrotic islets nor on the size of the necrotic area (Figures 2A, B, C and D).

Islet viability

Fluorescence microscopy was used to determine the proportion of dead cells within encapsulated islets. We observed a gradual 50 % decrease in the number of viable encapsulated islet equivalents in all microcapsule types before reaching a plateau at 21 days post-isolation (data not shown). There was, however, no significant difference between types of microcapsules (data not shown). A viability index was calculated to further characterize the effect of microcapsule MWCO on the viability of islets (Figures 3A and B). Compared to medium MWCO (0.01 % PLL) and high MWCO (PLL-free) microcapsules, over a period of 2 to 56 days post-isolation, low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules had a significantly reduced viability index (Figure 3A; $p < 0.05$). The majority of dead cells were located at the periphery of the islet in low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules (Figure 4). There was no significant difference between high MWCO (PLL-free) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules (Figure 3A) nor between high MWCO (PLL-free) and medium MWCO (PLL-free) microcapsules (Figure 3B).

In vivo studies

Transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules into diabetic mice induced normoglycemia in 83 % (5/6) of recipients (Figure 5A). Progressive recurrence of hyperglycemia was, however, observed. Only 33 % (2/6) and 20 % (1/5) remained normoglycemic at 58 and 117 days, respectively (Figure 5A). Transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules induced normoglycemia in 100 % (6/6) of recipients, 33 % (2/6) or which remained normoglycemic at 44 days (Figure 5A). When 500 islet equivalents encapsulated in high MWCO (PLL-free) microcapsules were transplanted into diabetic mice, normoglycemia was induced in all recipients, 100 % (6/6) were still normoglycemic at 89 days (Figure 5A). The differences were statistically significant from day 44 to 117 between medium MWCO (0.01 % PLL) and high MWCO (PLL-free) microcapsules and from day 58 to 117 between low MWCO (0.08 % PLL) and high MWCO (PLL-free) microcapsules (Figure 5A; $p < 0.05$). The average blood glucose levels remained normal (< 9 mM) until the end of the study in the high MWCO (PLL-free) group whereas it progressively increased above 11 mM at 44 and 89 days in the medium MWCO (0.01 % PLL) and low MWCO (0.08 % PLL) groups respectively (Figure 5C).

Transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in medium MWCO (PLL-free) microcapsules into diabetic mice induced normoglycemia in 100 % (6/6) of recipients (Figure 5B). Although progressive recurrence of hyperglycemia was observed, 83 % (5/6) and 40 % (2/5) remained normoglycemic at 44 and 257 days, respectively (Figure 5B). There was no significant difference between the two groups of islets encapsulated in PLL-free alginate (Figure 5B). The average blood glucose remained within normal limits throughout the study, not significantly different from the high MWCO (PLL-free) group (Figure 5D).

DISCUSSION

Size exclusion chromatography using carbohydrate markers (dextrans) of known MWs is the method of choice to evaluate microcapsule MWCO (11, 15, 27). Proteins can be used as a complement to dextran to further characterize the microcapsule MWCO (11, 16, 28). There were apparent discrepancies between the exact MWCO obtained with dextrans and proteins, which can be explained by the fact that dextrans are linear, neutral carbohydrate molecules, whereas proteins are globular, charged molecules. These discrepancies became, nevertheless, irrelevant when the results were compared in terms of viscosity radius, which provides an estimate of the molecule diameter (Table III). Conditions yielding low, medium and high MWCO microcapsules were established (Table III).

Low and medium MWCO were produced using 0.08 % and 0.01 % PLL, respectively. All attempts at producing high MWCO microcapsules using PLL concentration lower than 0.01 %, however, resulted in the production of inadequate microcapsules. Omitting the PLL incubation step did, however, allow for the production of high MWCO microcapsules (PLL-free Ca^{2+} alginate microcapsules). An additional condition, (PLL-free Ba^{2+} alginate) provided medium MWCO, allowing comparison of medium and high MWCO in PLL-free conditions. It should be noted that barium microcapsules are usually not coated with PLL.

Considering the *in vivo* transplantation experiments, the comparison (Figures 5A and 5C) of low MWCO (0.08 % PLL), medium MWCO (0.01 % PLL) and high MWCO (PLL-free) Ca^{2+} alginate microcapsules suggested that the use of the low MWCO may decrease islet survival. The use of the low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules resulted in decreased islet survival and higher blood glucose levels than with the high MWCO (PLL-free) microcapsules. The use of the medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules decreased islet survival and increased mean blood glucose compared to the high MWCO (PLL-free) microcapsules. These results could be explained by the different microcapsule PLL content. There were no significant differences, in either islet survival or in the average blood glucose levels (Figures 5B and 5D), between medium MWCO (PLL-free Ba^{2+}

alginate) and high MWCO (PLL-free Ca^{2+} alginate) microcapsules, suggesting that, in the absence of PLL the use of medium or high MWCO has a similar effect on islet survival.

The *in vivo* experiments alone could not determine if the decrease islet survival with low, as compared to the medium MWCO, was due to a lower MWCO or to a deleterious effect of PLL. Either a direct toxic effect of PLL on islet cells, a triggering of a host reaction against microcapsules or both, could explain such a potential harmful effect of PLL. *In vitro* experiments avoided the confounding effect of a potential host reaction against PLL. The results of *in vitro* studies showed that there were no significant differences in islet central necrosis between the different types of microcapsules (Figure 1). Central necrosis is caused mainly by a decreased nutrient supply (29-32), which is confirmed by the finding that central necrosis was observed essentially in larger islets. The potential negative effect of a decreased MWCO on islet survival could, in theory, be explained by decreased nutrient supply. The absence of effect of the MWCO on central necrosis is, therefore, strong evidence against the hypothesis that, within the range studied, the MWCO affected islet survival.

Islet viability tests showing that, in the absence of PLL, there was no difference between medium and high MWCO confirmed *in vivo* as well as central necrosis study findings (Figure 3). Islets encapsulated in medium MWCO (0.01 % PLL) and high MWCO (PLL-free) microcapsules demonstrated similar viability (in contrast to *in vivo* studies). Islets encapsulated in low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules showed significantly lower viability than medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules whether studied *in vivo* or *in vitro*.

In vivo studies and *in vitro* central necrosis studies, which suggested no effect of MWCO on islet survival. Low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules showed decreased viability both *in vitro* and *in vivo*, medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules showed decreased viability only *in vivo*. This suggests that at a concentration of 0.08 % but not one of 0.01 %, PLL has direct islet cell toxicity, whereas at both concentrations, PLL triggers a host anti-microcapsules reaction. This interpretation is supported by two observations: 1- *in vitro*, with 0.08 % PLL microcapsules, most dead cells were located at the periphery of islets (Figure 4), which is more likely caused by a direct toxic effect, whereas decreased

nutrient supply would induce central necrosis, and 2- the difference between low MWCO (0.08 % PLL) and the other conditions does not increase (and even slightly decreases and disappears) with time. This would be expected with decreased nutrient supply (Figure 3A). Recent reports suggest that PLL may affect the biocompatibility of microcapsules in a negative way (33, 34). Strand et al. (35) have reported a direct toxic effect of PLL on islets. They have also shown that this effect is decreased when islets are protected by alginate (35). It is, therefore, likely that at a lower concentration (0.01 %), a negligible amount of PLL would reach the islets, thus explaining the absence of deleterious effect *in vitro*. Since immune cells interact with PLL that is concentrated at the periphery of microcapsules, a low concentration of PLL (0.01 %) is, nonetheless, sufficient to trigger an immune reaction.

That the use of PLL may have a deleterious effect on islet viability, and that the use of PLL-free Ba²⁺ alginate microcapsules is a good strategy to promote long term islet survival are in agreement with the recent publication by Duvivier-Khali et al. (18). They have induced prolonged (> 1 years) normoglycemia in NOD mice with allogeneic transplantation of islets encapsulated in PLL-free Ba²⁺ alginate microcapsules (18). These results, as well as the recent theory suggesting that allograft rejection is mostly a consequence of direct antigen presentation (36, 37), suggest that PLL (which establishes the permselective properties of the microcapsule membrane) is not required and should probably be avoided in allotransplantations. However, the situation may be different for xenotransplantation and for stem cell derived or bioengineered insulin-producing cells. The possibility that, in other settings, a reduced MWCO may provide advantages for immunoprotection or to prevent the dissemination of encapsulated materials has not been excluded. In this context, the knowledge provided by the present study is useful. PLL could be used at concentrations lower than 0.08 %, but with longer incubation times, to avoid direct toxic effect on islets. Better methods to coat PLL may be developed to prevent the host reaction to PLL. Alternative biomaterials could also be investigated or developed. The fact that reducing the MWCO is not harmful for islet survival is useful information that was previously not available.

The present study did not confirm the initial hypothesis that increasing the MWCO would have a major positive effect on microencapsulated islet survival. In the range

studied, the membrane MWCO did not significantly affect islet survival. The use of PLL may, however, have a deleterious effect. At 0.08 % it has a direct toxic effect on islets. At lower concentrations, PLL may trigger a host reaction if not appropriately coated. The encapsulation of islets in PLL-free Ba^{2+} alginate provided the best results for islet survival.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Juvenile Diabetes Research Foundation International (Grant number: 1-1999-659). R.R. received a joint studentship from the Fond de la Recherche en Santé du Québec and the Fond des Chercheurs et Aide à la Recherche. Karine Desbiens and Julie Dusseault are recipients of a studentship from the Association Diabète Québec. The authors thank François Leblond and Josée Tessier for technical support.

REFERENCES

1. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343 (4): 230.
2. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; 50 (4): 710.
3. Benhamou PY, Oberholzer J, Toso C, et al. Human islet transplantation network for the treatment of Type I diabetes: first data from the Swiss-French GRAGIL consortium (1999-2000). *Diabetologia* 2001; 44 (7): 859.
4. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210 (4472): 908.
5. Fan MY, Lum ZP, Fu XW, Levesque L, Tai IT, Sun AM. Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes* 1990; 39 (4): 519.
6. O'Shea GM, Goosen MF, Sun AM. Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Biochim Biophys Acta* 1984; 804 (1): 133.
7. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 1992; 54 (5): 769.
8. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (12): 5843.
9. Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 1996; 98 (6): 1417.
10. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994; 343 (8903): 950.

11. Robitaille R, Leblond FA, Bourgeois Y, Henley N, Loignon M, Halle JP. Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography. *J Biomed Mater Res* 2000; 50 (3): 420.
12. Halle JP, Leblond FA, Landry D, Fournier A, Chevalier S. Studies of 300-microns microcapsules: I. Use of arginine esterase release by microencapsulated prostatic cells as a measure of membrane permeability. *Transplant Proc* 1992; 24 (6): 2930.
13. Halle JP, Bourassa S, Leblond FA, et al. Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes. *Transplantation* 1993; 55 (2): 350.
14. Hahn HJ, Kuttler B, Volk HD, et al. Prolongation of allogeneic islet grafts in spontaneously diabetic BB/OK rats after short-term recipient treatment with monoclonal anti-IL-2 receptor antibody and cyclosporin. *Diabetes* 1989; 38 (Suppl. 1): 286.
15. Brissova M, Petro M, Lacik I, Powers AC, Wang T. Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Anal Biochem* 1996; 242 (1): 104.
16. Brissova M, Lacik I, Powers AC, Anilkumar AV, Wang T. Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system. *J Biomed Mater Res* 1998; 39 (1): 61.
17. Vandenbossche GM, Van Oostveldt P, Remon JP. A fluorescence method for the determination of the molecular weight cut-off of alginate-polylysine microcapsules. *J Pharm Pharmacol* 1991; 43 (4): 275.
18. Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, O'Neil JJ, Weir GC. Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes* 2001; 50 (8): 1698.
19. Klock G, Frank H, Houben R, et al. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 40 (5): 638.
20. Prokop A, Wang TG. Purification of polymers used for fabrication of an immunoisolation barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 831: 223.
21. Halle JP, Leblond FA, Pariseau JF, Jutras P, Brabant MJ, Lepage Y. Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 1994; 3 (5): 365.

22. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16 (1): 35.
23. Scharp DW, Lacy PE, Finke E, Olack B. Low-temperature culture of human islets isolated by the distention method and purified with Ficoll or Percoll gradients. *Surgery* 1987; 102 (5): 869.
24. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 1999; 161 (3): 357.
25. Bank HL. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia* 1987; 30 (10): 812.
26. Bank HL. Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 1988; 24 (4): 266.
27. Powers AC, Brissova M, Lacik I, Anilkumar AV, Shahrokhi K, Wang TG. Permeability assessment of capsules for islet transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 831: 208.
28. Stewart WW, Swaisgood HE. Characterization of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards. *Enzyme Microbiology & Technology* 1993; 15: 922.
29. Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML. Effect of oxygen on isolated pancreatic tissue. *ASAIO Trans* 1989; 35 (3): 739.
30. Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 1993; 42 (1): 12.
31. Rafael E, Wernerson A, Arner P, Wu GS, Tibell A. In vivo evaluation of glucose permeability of an immunoisolation device intended for islet transplantation: a novel application of the microdialysis technique. *Cell Transplant* 1999; 8 (3): 317.
32. Schrezenmeir J, Gero L, Laue C, et al. The role of oxygen supply in islet transplantation. *Transplant Proc* 1992; 24 (6): 2925.
33. de Vos P, Hoogmoed CG, Busscher HJ. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *J Biomed Mater Res* 2002; 60 (2): 252.
34. De Vos P, Van Hoogmoed CG, De Haan BJ, Busscher HJ. Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. *J Biomed Mater Res* 2002; 62 (3): 430.

35. Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, et al. Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant* 2001; 10 (3): 263.
36. Gray DW. Encapsulated islet cells: the role of direct and indirect presentation and the relevance to xenotransplantation and autoimmune recurrence. *Br Med Bull* 1997; 53 (4): 777.
37. Gray DW. An overview of the immune system with specific reference to membrane encapsulation and islet transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944: 226.

TABLES

Table I. Dextran diffusion trough different types of microcapsules: results of reverse size exclusion chromatography studies

Dextrans (kDa)	R η (nm)	K _{sec}			
		Ca ²⁺ -alginate	Ca ²⁺ -alginate	Ba ²⁺ -alginate	Ca ²⁺ -alginate
		PLL 0.08 % capsules	PLL 0.01 % capsules	PLL-free capsules	PLL-free capsules
2000	34.2	0.0	0.0	0.0	0.0
148.3	9.4	0.0	0.0	0.1	0.1
71.2	6.6	0.0	0.0	0.0	<u>0.7</u>
69.0	6.5	0.0	0.0	0.0	-
40.5	5.0	0.0	0.0	0.1	0.7
38.6	4.8	0.0	0.0	0.1	0.7
19.6	3.5	0.0	<u>0.6</u>	<u>0.6</u>	-
19.5	3.5	0.0	0.7	0.6	0.8
9.4	2.4	<u>0.7</u>	0.7	0.7	0.8
4.4	1.7	0.8	0.8	0.7	0.8
Glucose (0.18)	0.4	1.0	1.0	1.0	1.0

R η : Viscosity radius

Table II. Protein diffusion through different types of microcapsules: results of reverse size exclusion chromatography studies

Proteins (kDa)	R η (nm)	K $_{\text{sec}}$			
		Ca $^{2+}$ -alginate	Ca $^{2+}$ -alginate	Ba $^{2+}$ -alginate	Ca $^{2+}$ -alginate
		PLL 0.08 % capsules	PLL 0.01 % capsules	PLL-free capsules	PLL-free capsules
IgG (160)	4.7	-	-	-	<u>0.6</u>
Transferrine (76-81)	3.7	0.0	0.0	0.2	0.8
BSA (66)	3.4	0.0	0.0	0.1	0.7
Ovalbumine (44)	2.9	0.0	<u>0.9</u>	0.4	0.8
Carboxypeptidase A (35.3)	2.7	0.0	0.9	<u>0.6</u>	-
SOD (31.2)	2.5	0.0	0.7	0.6	-
Anhydrase Carbonique (29)	2.5	<u>0.8</u>	0.9	0.8	-
SBTI (20.1)	2.2	0.8	0.7	0.8	-
Phospholipase A $_2$ (14.5)	1.9	0.9	1.0	0.8	-
IGF-II (7.5)	1.5	0.8	-	0.8	-

R η : Viscosity radius; IgG: immunoglobulin type G; BSA: bovine serum albumin; SOD: superoxide dismutase; SBTI: soybean trypsin inhibitor

Table III. Viscosity radius and molecular weight of dextran and proteins that permeate into different types of microcapsules: summary

		Ca ²⁺ -alginate PLL-0.08 % capsules	Ca ²⁺ -alginate PLL 0.01 % capsules	Ba ²⁺ -alginate PLL free capsules	Ca ²⁺ -alginate PLL-free capsules
Viscosity radius (R _η)	Dextrans	≤ 2.4	≤ 3.5	≤ 3.5	≤ 6.6-
	Proteins	≤ 2.5	≤ 2.9	≤ 2.7	≤ 4.7
Molecular weight (kDa)	Dextrans	≤ 9.4	≤ 19.6	≤ 19.6	≤ 71.2
	Proteins	≤ 29.0	≤ 44.0	≤ 35.3	≤ 160
		Low MWCO	Medium MWCO	High MWCO	

FIGURES

Figure 1 A)

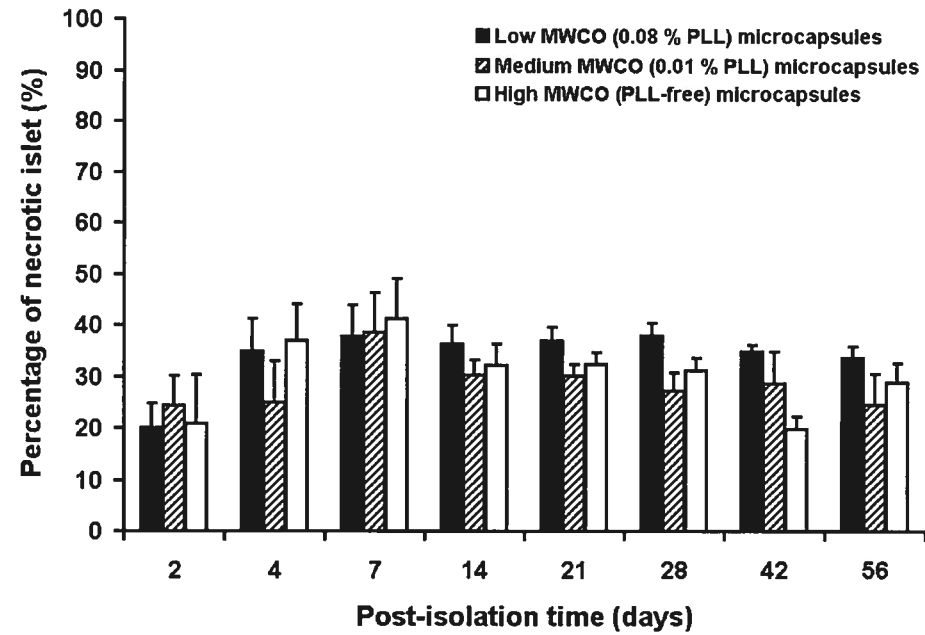


Figure 1 B)

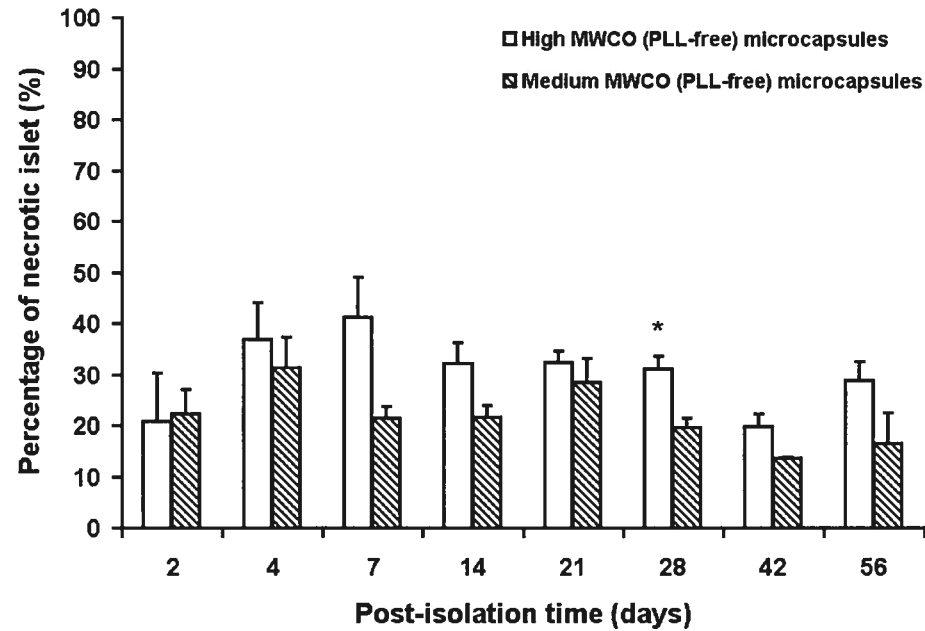


Figure 2 A)

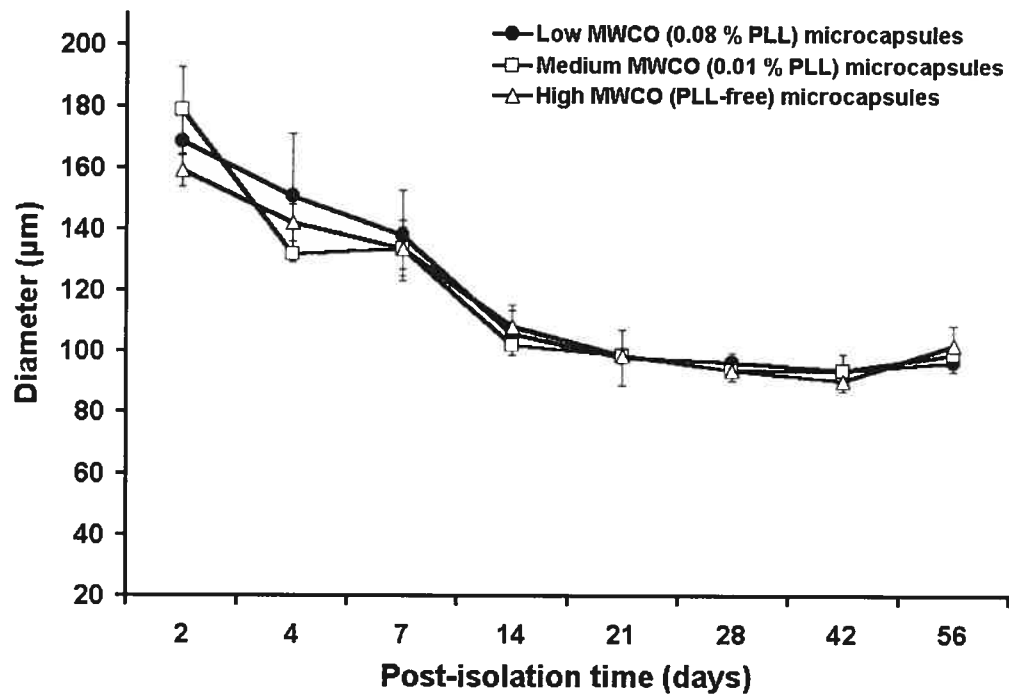


Figure 2 B)

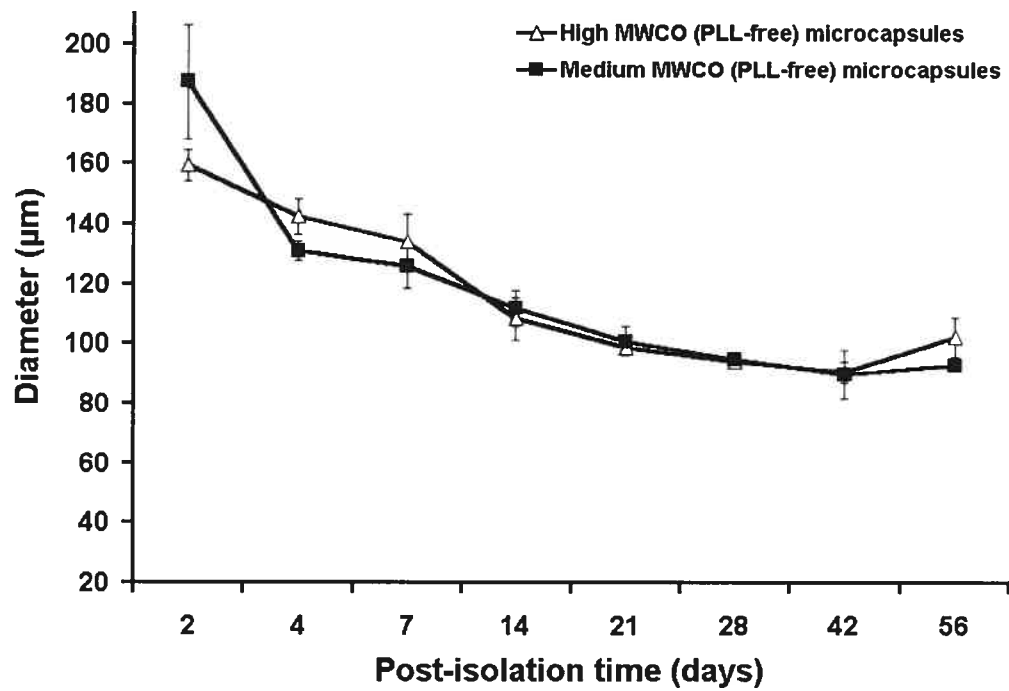


Figure 2 C)

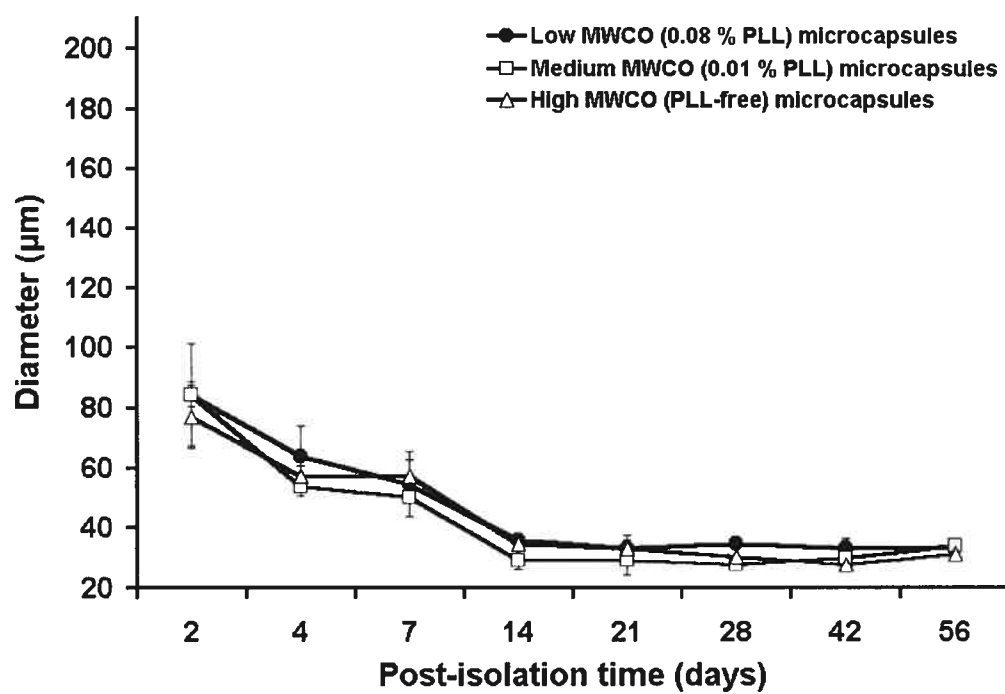


Figure 2 D)

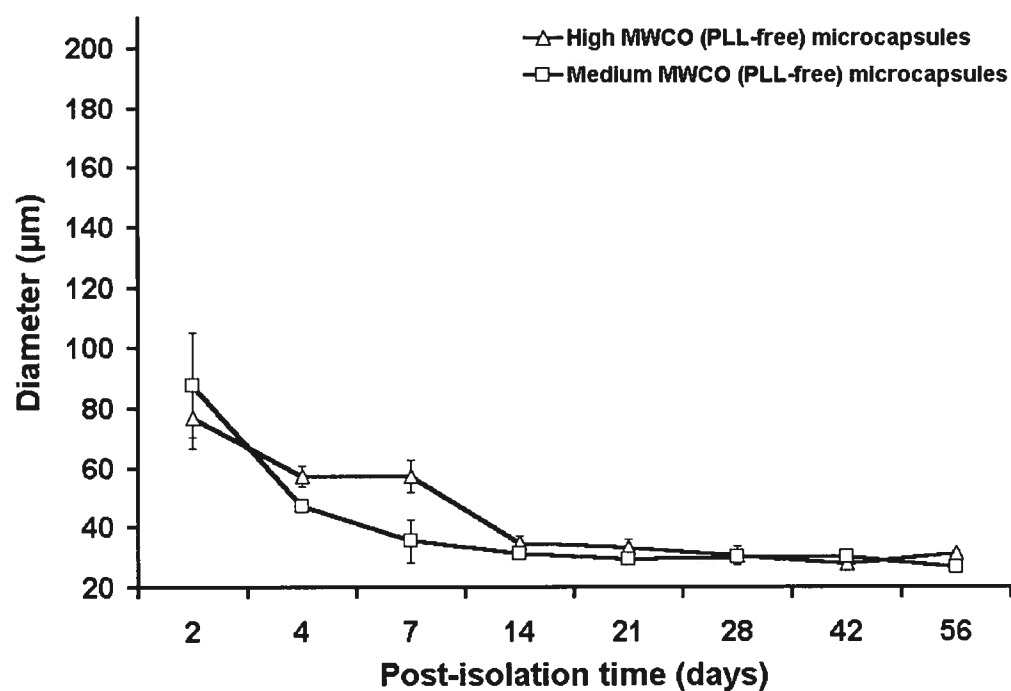


Figure 2 E)

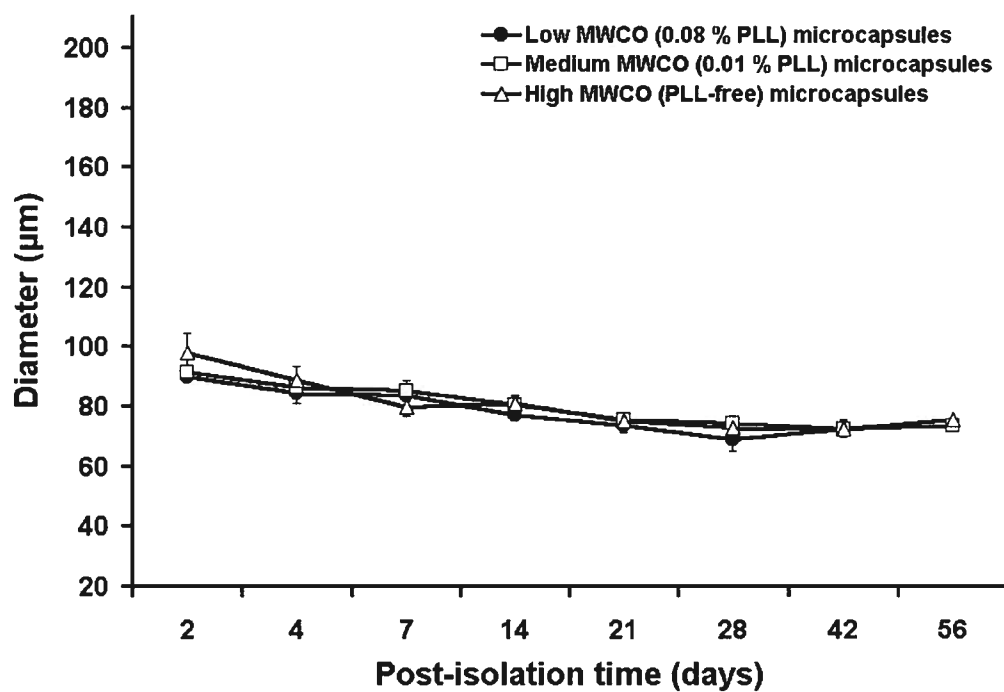


Figure 2 F)

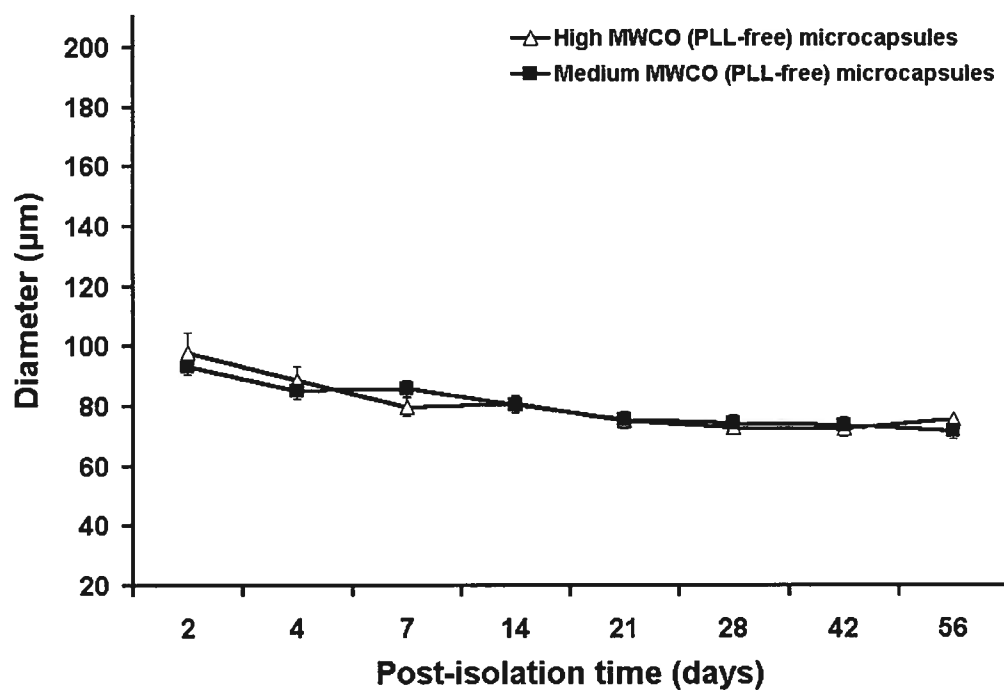


Figure 3 A)

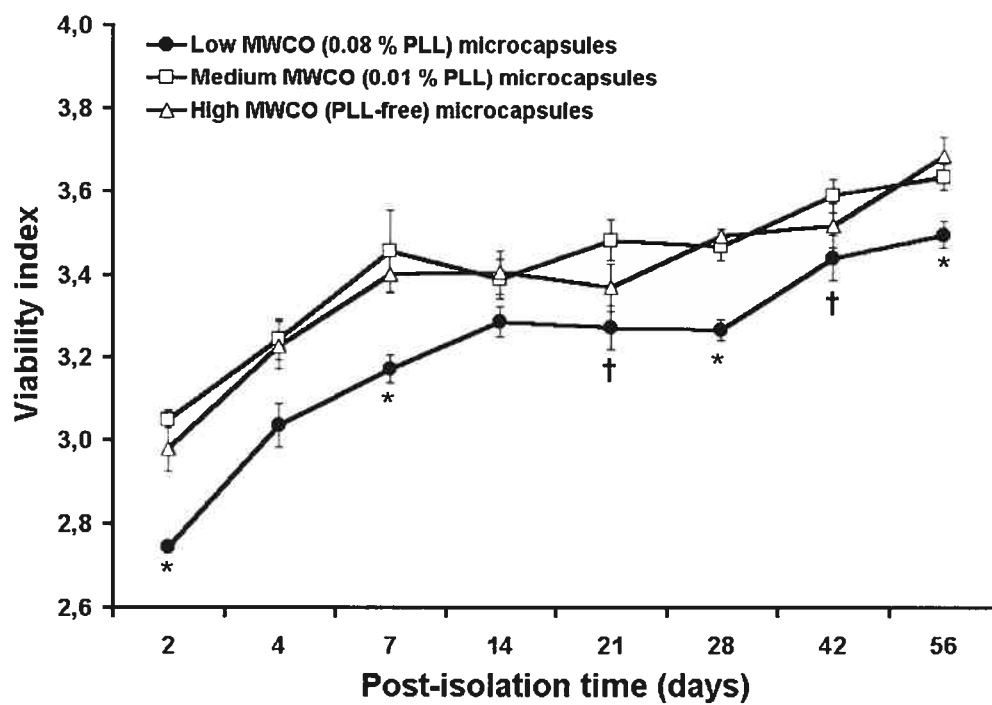


Figure 3 B)

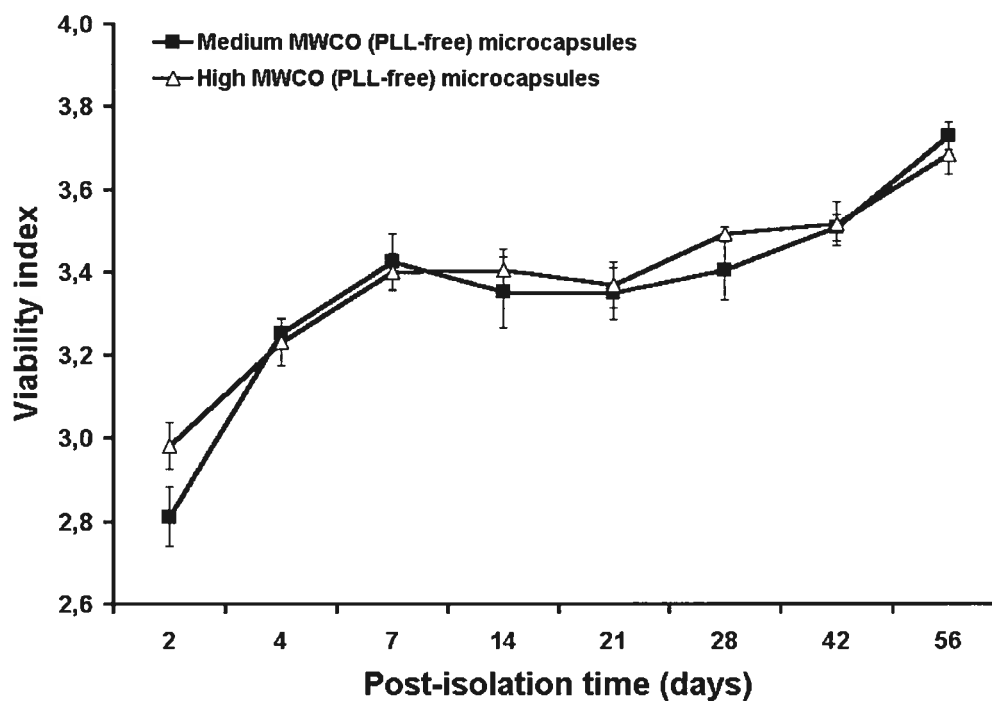


Figure 4

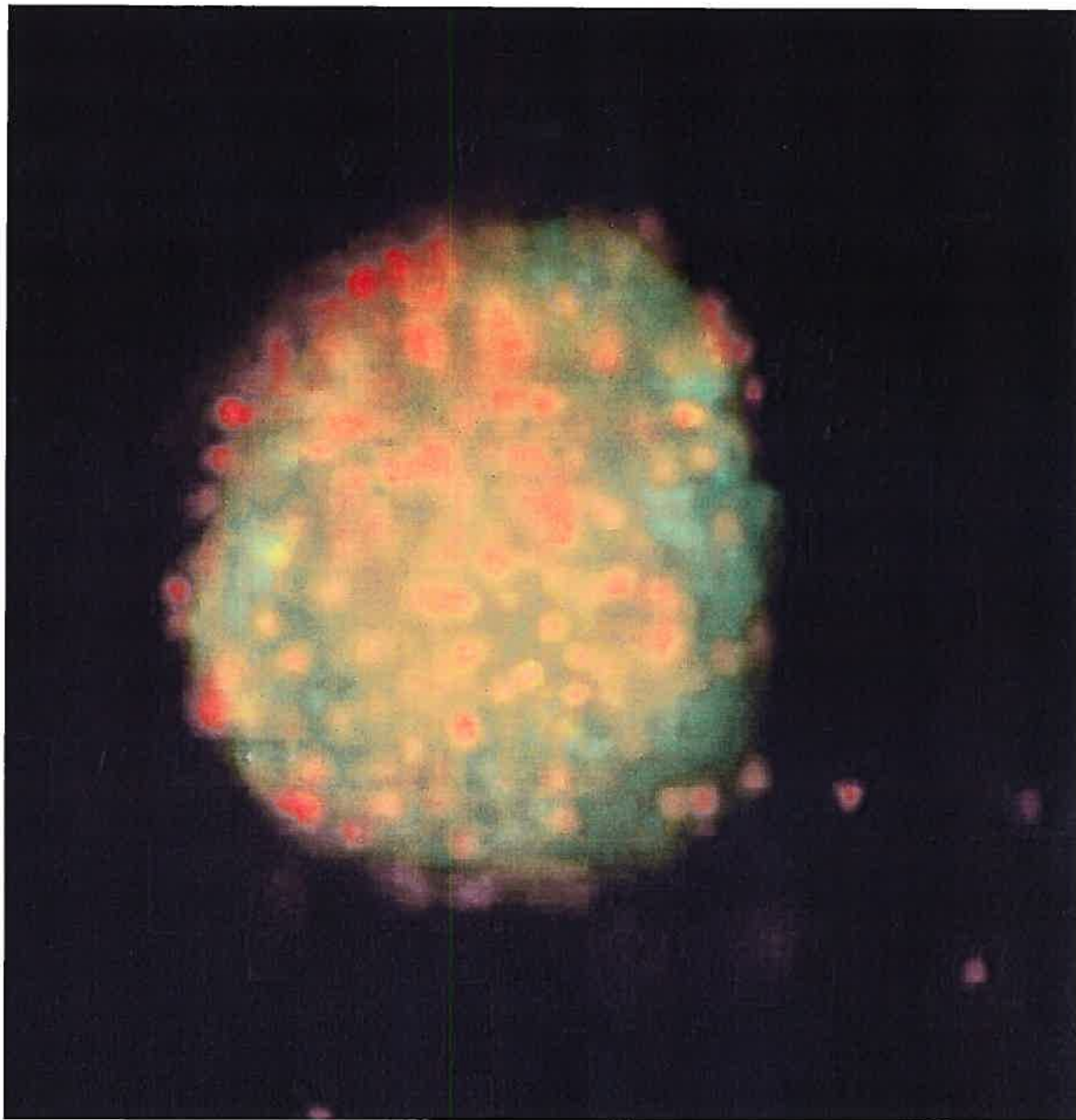


Figure 5 A)

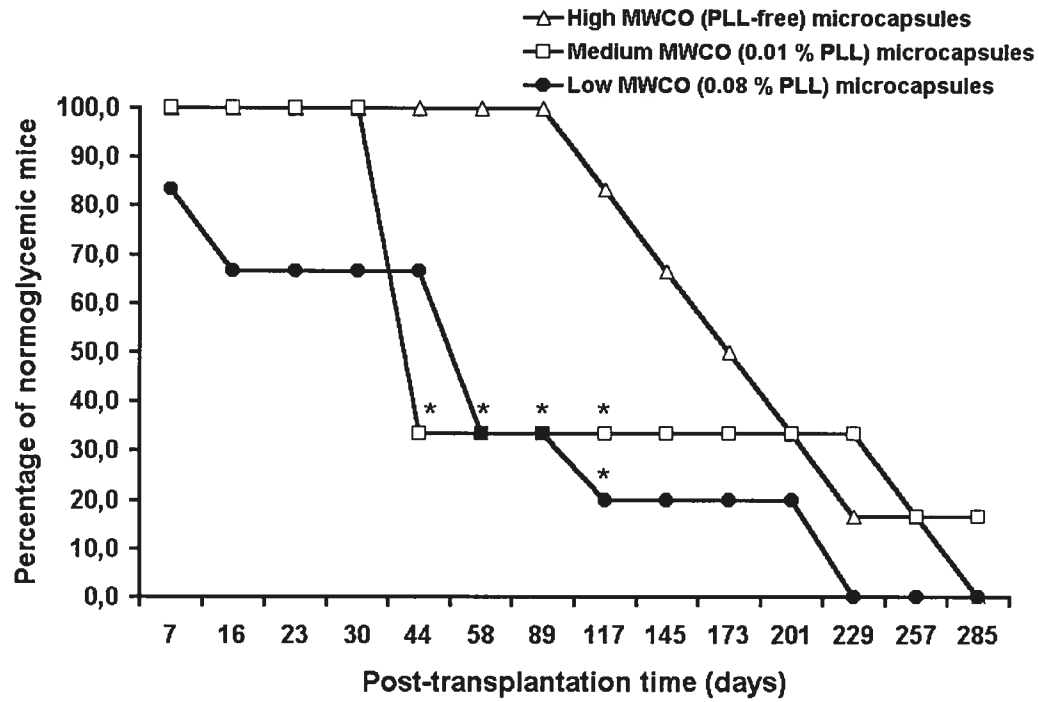


Figure 5 B)

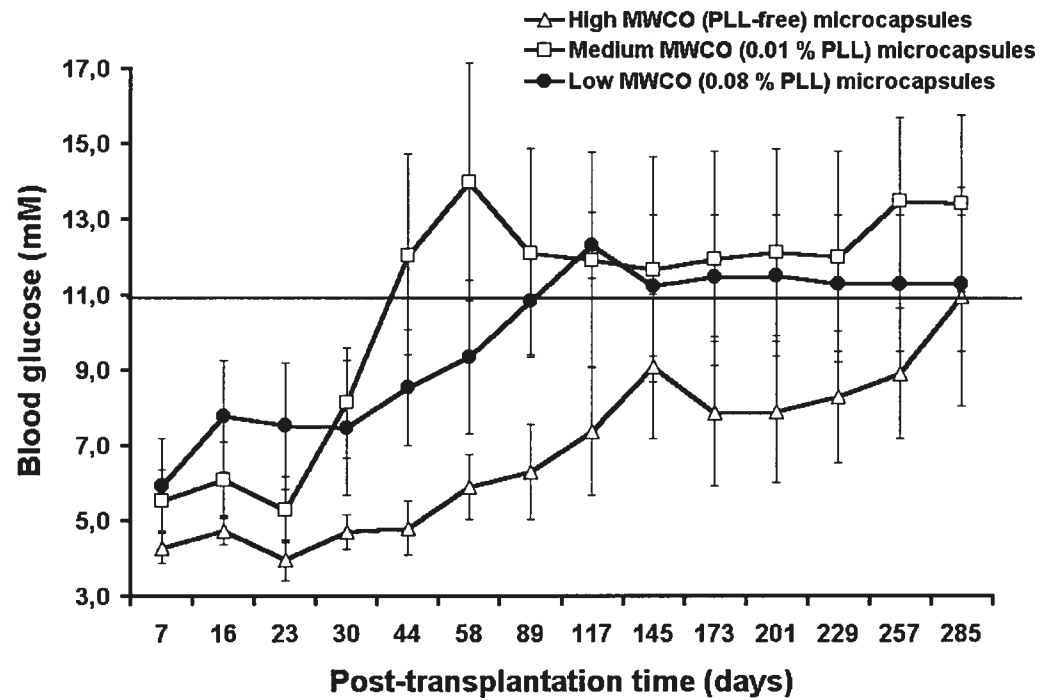


Figure 5 C)

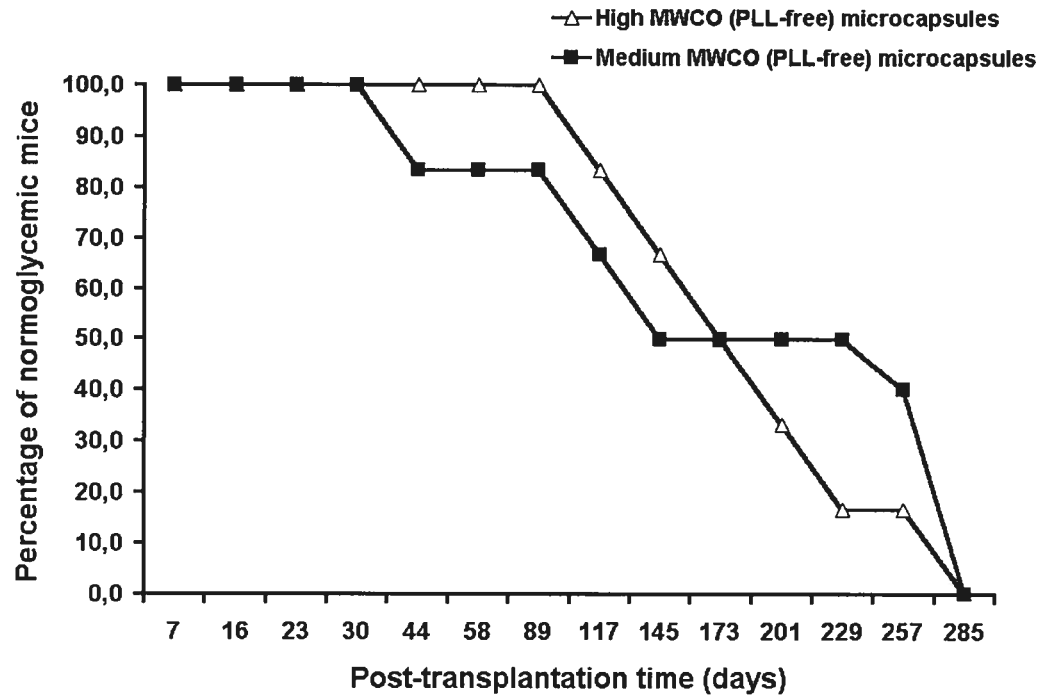
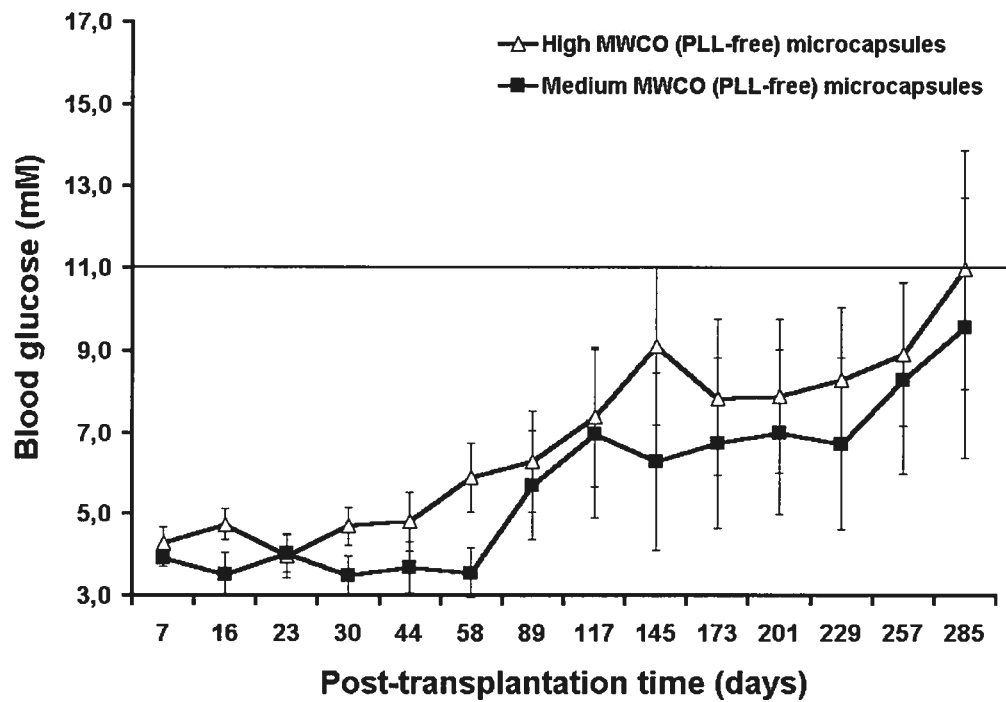


Figure 5 D)



LEGEND FOR FIGURES

Figure 1. Effect of MWCO on encapsulated islet cell death. Aliquots of 150 encapsulated islets per experimental condition were studied under an inverted microscope. The number of islets with central necrosis was expressed as the percentage of the total islet equivalent number. Experiments were performed on three different islet preparations ($n = 3$). Data are expressed as mean \pm SEM. **(A)** Percentage of necrotic islets encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium (0.01 % PLL) MWCO microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(B)** Percentage of necrotic islets encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules. * $p < 0.05$.

Figure 2. Effect of MWCO on encapsulated islet morphology. Aliquots of 150 encapsulated islets per experimental condition were observed under inverted light microscope and islet diameter (μm) and the diameter (μm) of the area of necrosis were determined using a calibrated scale mounted in the eyepiece of the microscope. Experiments were performed on three different islet preparations ($n = 3$). Data are expressed as mean \pm SEM. **(A)** Mean diameter of necrotic islets encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(B)** Mean diameter of necrotic islets encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(C)** Mean diameter of necrotic area of islets encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(D)** Mean diameter of necrotic area of islets encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(E)** Mean diameter of non-necrotic islets encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(F)** Mean diameter of non-necrotic islets encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules.

Figure 3. Effect of MWCO on encapsulated islet viability. Aliquots of 150 encapsulated islets per experimental condition were stained with PI and AO. Each encapsulated islet was graded and from this viability index was calculated as described in material and methods. Experiments were performed on three different islet preparations ($n = 3$). Data are expressed as mean \pm SEM. **(A)** Viability index of islets encapsulated in low (0.08 % PLL)

and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. * $p < 0.05$ vs. medium MWCO (0.01 % PLL) and high MWCO (PLL-free) microcapsules, † $p < 0.05$ vs. medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules. **(B)** Viability index of islets encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules.

Figure 4. Photomicrograph showing the effect of low MWCO (0.08 % PLL) microcapsules on islet viability. Islet cell viability was evaluated using fluorescence microscopy with propidium iodide (dead cells, red) and acridine orange (living cells, green) staining. Note the presence of numerous dead cells (red) at the periphery of the islets. Original magnification 100X.

Figure 5. Effect of MWCO on *in vivo* encapsulated islet survival after transplantation into diabetic mice. Following isolation, islets were cultured in UltraCULTURE media until transplantation within 24 hours post encapsulation. **(A)** Percentage of normoglycemic mice following transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. At day 0, $n = 6$ for all groups. * $p < 0.05$ vs. high MWCO (PLL-free) microcapsules. **(B)** Percentage of normoglycemic mice following transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules. At day 0, $n = 6$ for both groups. **(C)** Mean blood glucose levels following transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in low (0.08 % PLL) and medium MWCO (0.01 % PLL) microcapsules and high MWCO (PLL-free) microcapsules. At day 0, $n = 6$ for all groups. Data are presented as mean \pm SEM. **(D)** Mean blood glucose levels following transplantation of 500 islet equivalents encapsulated in medium MWCO (PLL-free) and high MWCO (PLL-free) microcapsules. At day 0, $n = 6$ for both groups. Data are presented as mean \pm SEM.

D.5. Étude 5. IGF-II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation

Robert Robitaille, Julie Dusseault, Nathalie Henley, Lawrence Rosenberg et Jean-Pierre Hallé.

Soumis à « Endocrinology »

Rôle des coauteurs :

Julie Dusseault et Nathalie Henley ont participé à la collecte des données et à la révision de l'article. Lawrence Rosenberg et Jean-Pierre Hallé ont participé à la conception du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'ai fait une contribution majeure en participant activement à la conception du projet, à la collecte des données, à l'analyse des résultats et à la rédaction de l'article. J'étais le premier responsable des travaux et des résultats de recherche donnant lieu à cet article.

IGF-II ALLOWS PROLONGED BLOOD GLUCOSE NORMALIZATION WITH A REDUCED ISLET CELL MASS TRANSPLANTATION

Abbreviated title: IGF-II improves islet cell viability

Robert Robitaille, M.Sc.¹, Julie Dusseault, B.Sc.¹, Nathalie Henley, M.Sc.¹,
Lawrence Rosenberg, M.D.² and Jean-Pierre Hallé, M.D.^{1,3}

¹ Université de Montréal, Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital,
5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada.

² McGill University Health Center, 1650 Cedar Avenue, Montreal, Quebec, H3G 1A4,
Canada.

³ **Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:**

Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital,
5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada.

Telephone: (514) 252-3563; Fax: (514) 252-3430

e-mail: hallejp@videotron.ca

Key Words: Diabetes Mellitus, Cell Death, Microencapsulation.

This work was supported by a grant from the Juvenile Diabetes Foundation International (Grant number: 6-2001-399). Robert Robitaille is a recipient of a joint studentship from the Fond de la Recherche en Santé du Québec and the Fond des Chercheurs et Aide à la Recherche. Julie Dusseault is a recipient of a studentship from the Association Diabète Québec.

ABSTRACT

IGF-II has been reported to decrease neonatal islet cell apoptosis and *in vitro* adult islet cell necrosis and apoptosis, but the usefulness of IGF-II in a transplantation setting is unknown. We evaluated the effect of *in vitro* IGF-II incubations on microencapsulated rat islet survival both *in vitro* and in minimal mass transplantations into diabetic mice. After 6 days in culture, fresh examinations, histology, fluorescence microscopy, XTT and apoptosis studies all indicated that IGF-II significantly improves islet cell viability in a dose dependent fashion. IGF-II 100 ng/mL and 500 ng/mL induced a 51% and 83% increase of viable islets ($p = 0.052$, $p < 0.01$). A 20%, 29% and 33% reduction of the apoptotic index was observed with 50, 100 and 500 ng/mL incubations respectively ($p < 0.05$, $p < 0.005$, $p < 0.001$). Ten weeks after transplantation of 150 encapsulated rat islet equivalents incubated with IGF-II 500 ng/mL, 80% of diabetic mice were normoglycemic. Without IGF-II pre-incubation, only 8% of the recipients remained normoglycemic with the transplantation of 150 islets and 42% with 300 islets ($p < 0.05$). In conclusion, IGF-II promotes islet cell survival, and allows successful transplantation using a smaller number of islets.

INTRODUCTION

Twenty-seven years of sustained work have been required to bring the concept of islet transplantation as proposed by Lacy (1), to successful clinical application, as recently reported by the Edmonton group (2, 3). The general application of this method is however limited by the low availability of human pancreas, the need to use pancreases from ≥ 2 donors for most recipients, and the requirement for continued immunosuppression (2-4). Immuno-isolation of islets in semipermeable membranes has been proposed by Chick as an alternative method to immunosuppression (5-7). Sun (8-12) and others (13-17) have succeeded in normalizing blood glucose in different animal models of diabetes, using microencapsulated islet allografts (8, 9, 13, 14, 16, 17) and xenografts (10-12, 15), without the use of immunosuppression. Nevertheless, extremely large numbers of microencapsulated islets (15 000-20 000 islets/kg) have to be transplanted to restore insulin independence (12-14). In addition, encapsulated islets usually fail within 6 to 10 months in these large animal models.

Islet cell mass is a function of balance between β -cell apoptosis and necrosis, and islet neogenesis and β -cell replication. Islet cells may be damaged during the isolation and encapsulation procedures, during *in vitro* culture and after *in vivo* implantation (18-21). Both apoptosis and necrosis occur during islet isolation and culture (18-21). A recent publication suggests that necrosis predominates *in vivo* for islets encapsulated in large diameter ($\geq 700 \mu\text{m}$) microcapsules (16). We have proposed that islets require trophic support to maintain long-term viability and that this support is provided within the pancreas (22, 23). A prerequisite for successful islet transplantation is the reconstitution of the

trophic support or, alternatively, the provision of relevant components (growth factors, extracellular matrix and duct cells including pluripotential precursor cells) necessary to increase islet cell mass (22, 23). We have recently shown that incubations of hamster islets with pancreatic duct cells or duct-conditioned medium prevents *in vitro* apoptosis and necrosis that occur after the islet isolation procedure (24). Duct-conditioned medium was shown to contain a small amount of nerve growth factor and much larger amounts of IGF-II, but no IGF-I (24). Incubations of islets with IGF-II alone have reproduced the effect of duct cells, and prevented apoptosis and necrosis (24). Hill and co-workers had previously reported that a fall in the islet cell expression of IGF-II is temporally associated with the developmental apoptosis that occurs in neonatal rats (25). In addition, they have shown, in a transgenic mouse model, in which IGF-II is overexpressed, that persistent circulating levels of IGF-II suppress neonatal islet cell apoptosis (26).

We hypothesized that pre-transplant incubations of microencapsulated islets with IGF-II would have beneficial trophic effects on the maintenance of a functional islet cell mass. Potential mechanisms could include decreasing the susceptibility of microencapsulated islet cells to apoptosis and necrosis. The objective of the present study was to evaluate the effect of incubating microencapsulated islets with IGF-II on the *in vitro* and *in vivo* (post-transplantation) survival of encapsulated islets, as well as to investigate the mechanisms of cell death involved. Our results indicate that *in vitro* incubations with IGF-II, during the pretransplantation period, prevent apoptosis and necrosis of encapsulated islet cells, and allow normalization of blood glucose in streptozotocin (STZ)-induced diabetic mice, using a smaller number of encapsulated islets (*i.e.*, less than 50%) than required in the absence of IGF-II.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250-400 g body weight; Charles River, St-Jean, QC, Canada) were used for islet isolation. Male B6.CB17-*Prkdc*^{scid}/SzJ mice (15-20 g body weight; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were used as recipients in transplantation experiments. This immuno-incompetent model was chosen to study islet survival without the confounding effect of immune-mediated death of β -cells. Protocols were reviewed and stated to conform to the ethical guidelines of the Canadian Council for Animal Care by the animal care ethic committee of Guy-Bernier Research Center of Maisonneuve-Rosemont Hospital. These guidelines were observed throughout the study.

Islet isolation

Islets were isolated and purified from rat pancreases according to a previously described procedure (1). Briefly, pancreases were infused via the common bile duct with HBSS, set apart and minced on ice. Digestion was performed with Type V collagenase (7.5 mg/mL; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) for 5 min at 37 °C. Islets were purified on a discontinuous Euroficoll gradient (Mediatech Inc., Herndon, VA), handpicked under an inverted light microscope, pooled and then separated to form four experimental groups: islets cultured without IGF-II and with 50, 100 and 500 ng/mL of IGF-II (ID Labs Inc., London, ON, Canada). Islets were cultured overnight in RPMI-1640 medium (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) with 11 mM glucose supplemented with 10% FBS (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada), 1% penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and with or without IGF-II in humidified air atmosphere

containing 5% CO₂. The IGF-II supplementation started the same day as islet isolation and lasted for the period of the *in vitro* study, and until the transplantation for the *in vivo* study.

Islet microencapsulation

In vitro experiments

Islets from the four experimental groups were microencapsulated in purified Keltone LV sodium alginate (ISP Alginates Inc., San Diego, CA) under endotoxin-free conditions. The sodium alginate was purified according to a previously described method (27). Islets were mixed with 1.8% sodium alginate at a final concentration of 5000 islets/mL. Islets were entrapped in small alginate beads by extrusion of the alginate solution through a 25 G needle using an electrostatic droplet generator (28). The alginate beads fell into a 100 mM calcium lactate solution, which crosslinked the alginate to form gel beads. The microcapsule membrane was formed by successively soaking the alginate beads in 0.05% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) for 5 min and 0.18% alginate for 5 min. This procedure was performed at room temperature. Microencapsulated islets (microcapsule diameter: 300-350 μ m) used for *in vitro* experiments were cultured for an additional 6 days in serum-free RPMI-1640 medium with 5.5 mM glucose supplemented with 1% penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution and with or without IGF-II at 37 °C in humidified air atmosphere containing 5% CO₂. This prolonged time in serum-free culture media (used only for *in vitro* experiments) was designed to evaluate the potential protective effect of IGF-II under conditions where islets have minimal nutrient supply. Islets are transplanted within 24 hours after encapsulation. The culture media were changed every second day as previously described (24).

In vivo experiments

Poly-L-lysine was recently shown to impair microcapsule biocompatibility (17, 29, 30). For *in vivo* experiments, the encapsulation protocol was modified to exclude poly-L-lysine coating to allow the study of islet survival without the confounding effect of biocompatibility issues. In brief, islets were microencapsulated in purified LVG sodium alginate (FMC Biopolymer, Philadelphia, PA) crosslinked with 10mM barium solution under endotoxin-free conditions. Microencapsulated islets used for transplantation experiments were cultured overnight in UltraCULTURE medium (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD) supplemented with 1% penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution with or without 500 ng/mL IGF-II at 37 °C in humidified air atmosphere containing 5% CO₂. This protocol was used to evaluate the additional benefits provided by IGF-II over the results obtained in optimal conditions.

Microencapsulated islet morphology

Inverted light microscopy

Aliquots of 150 islets per experimental condition were studied under an inverted microscope. The number of encapsulated islets with central necrosis was evaluated and expressed as the percentage of the total islet number as previously described (24). Islet diameter (μm) and the diameter (μm) of the area of necrosis were determined using a calibrated scale mounted in the eyepiece of the microscope.

Histology

At the end of the incubation period, samples of encapsulated islets from each experimental group were entrapped in 2% low-melting agarose (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada), fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Serial sections (4 μm thick and 150 μm apart) were cut from each block and

processed for routine light microscopy (staining with heamatoxylin and eosin) or for immunocytochemistry.

Microencapsulated islet cell viability and function

Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was used, as previously described (31, 32), to evaluate islet cell viability at the end of the incubation period. In brief, aliquots of 150 microencapsulated islets were stained with propidium iodide (PI; 0.5 $\mu\text{g/mL}$; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada), and acridine orange (AO; 2.4 ng/mL; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) and the number of microencapsulated islets showing more than 50% of viable cells were counted and expressed as a percentage of the total.

Sodium 3'-[1-(phenyl-amino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro)-benzene sulfonic acid hydrate (XTT) assay

Islet viability was also quantitatively assessed, at the end of the incubation period, using the XTT assay (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). An aliquot of 150-500 islet equivalents (one islet equivalent equals one 150 μm -diameter islet) was incubated in an RPMI-1640 with XTT salt in a 96-well plate for 24 hours at 37 °C in humidified air atmosphere containing 5% CO_2 . XTT is metabolized by mitochondria of viable cells to soluble formazan, which can be detected with an ELISA plate reader (absorbance wavelength: 450 nm; reference wavelength: 620 nm). The formazan production was normalized for 150 islet equivalents.

Apoptosis detection assay

A TUNEL assay was used, as previously described (24), to identify apoptotic cells. Briefly, at the end of the incubation period, samples of microencapsulated islets were prepared for histology (see above) and the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) was used for labeling apoptotic cells. The sections were developed by immunocytochemistry using anti-fluorescein antibody conjugate with alkaline phosphatase conjugate and Fast Red substrate (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). To reduce non-specific labeling, the sections were treated with Universal Protein Blocker (Dako Diagnostics Inc., Mississauga, ON, Canada). The sections were counterstained with hematoxylin. Approximately 800 cells from ten islets were counted in each group using image analysis software, and the apoptotic index was calculated (24). To identify which islet cells were apoptotic, the TUNEL assay and immunocytochemistry using anti-insulin antibody (Dako Diagnostics Inc., Mississauga, ON, Canada) were performed on consecutive sections. The sections were immunostained using anti-insulin antibody (dilution 1:100) and streptavidin-biotin-peroxidase complex. To reduce non-specific labeling, the sections were treated with Universal Protein Blocker. Insulin was detected using DAB substrate (Dako Diagnostics Inc., Mississauga, ON, Canada) to obtain a dark brown reaction product.

Perfusion (glucose stimulation of insulin secretion)

Aliquots of 150 islet equivalents were tested at the end of the incubation period using a perfusion procedure (Acusyst-S Cell Culture System; Forma Scientific, Marietta, OH). Islets were perfused at the rate of 1 mL/min for 1 hour at 37°C with RPMI-1640 media, which was gassed with 95% air–5% carbon dioxide, and maintained at pH 7.4. The RPMI-1640 media contained 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin-glutamine 100X solution and basal glucose, 3.3 mM. Basal samples were collected at 15-minute intervals

for 60 minutes before the glucose concentration in the perfusate was raised to 16.5 mM, and effluent samples were also collected at 15-minute intervals for 75 minutes. The media was then supplemented with 10 mM theophylline (Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada) and effluent samples were also collected at 15-minute intervals for another 75 minutes. The islets were finally perfused with the basal glucose perfusate for 75 minutes with sample collections at 15-minute intervals. All samples collected on ice were stored at frozen until radioimmunoassay for insulin (Cederlane Laboratories Limited, Hornby, ON, Canada). Data was presented as mean insulin-release stimulation index (SI). SI were obtained by calculating the ratio of high-glucose stimulated insulin release (16.5 mM glucose) on the basal insulin release (3.3 mM glucose).

Microencapsulated islet transplantation

Recipients

Diabetes in mice was induced by intraperitoneal injection of STZ (185 mg/kg body weight in sodium citrate buffer, pH 4.5; Sigma-Aldrich Ltd., Oakville, ON, Canada). Blood glucose of all mice rose above 20 mM within 2 days post-injection of STZ. Daily subcutaneous ultralente insulin injections were used to maintain mice alive (Humulin U®, 2U/day/mouse, Eli Lilly, Toronto, ON, Canada). Diabetic mice (blood glucose >20 mM for 2 successive days) were used as recipients for microencapsulated islet transplantations 14 days post-injection of STZ. Control groups included diabetic mice transplanted with non-encapsulated islets, and non-transplanted mice.

Transplantation

After islet isolation, the islet preparation was carefully and uniformly suspended, and split in 2 equal aliquots, which were randomly assigned to the 2 experimental groups

(incubations with and without IGF-II). After 24 hours in culture with or without IGF-II, islets were microencapsulated, and incubated another 24 hours, with or without IGF-II. Just before transplantation, islet-containing microcapsules were carefully and uniformly suspended, and aliquots of each group were counted, by a blinded observer, to determine the number of islet equivalents per volume using a calibrated scale mounted in the eyepiece of the microscope. Using the concentration of islets per volume, the islet preparation was separated to form the transplantation aliquots (150 and 300 islet equivalents). Microencapsulated or non-encapsulated (additional controls) rat islet aliquots were transplanted via a 16 G catheter into the peritoneal cavity of diabetic mice anesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, 50mg/kg body weight; MTC Pharmaceutical, Cambridge, ON, Canada). The last insulin injection was given at the time of transplantation to minimize the hyperglycemic stress to which islets would be submitted during the first hours post transplantation.

Follow up of diabetic animals

Recipient mice had free access to water and food (Mouse colony chow 5018; Agribrands Purina, ON, Canada). Blood glucose levels in samples obtained from mouse-tail veins were measured (Glucometer Elite, Bayer Inc., Toronto, ON, Canada) every day during the first week post-transplantation and then at least once a week for the remainder of the study. Mice were considered normoglycemic when glucose levels were < 11 mM on two consecutive days. Mice were sacrificed after 7 days if still diabetic or 7 days after reoccurrence of diabetes. In order not to introduce a bias supporting our hypothesis, mice (1 mouse in each IGF-II treated group) that died while normoglycemic were considered diabetic at the time of death.

Statistical analysis

All *in vitro* experiments were performed five times and the results are expressed as mean \pm SEM. The differences between experimental groups were analyzed by unpaired Student's *t*-test with *p* values less than 0.05 considered significant. The pre-determined primary end-point of the *in vivo* experiments was the number of mice achieving normoglycemia after transplantation. The differences between experimental groups within a category were analyzed by Chi-squared test with *p* values less than 0.05 considered significant.

RESULTS

In vitro studies

Islet morphology

For *in vitro* studies, after microencapsulation, islets were cultured in minimally nutritive (serum free) media. At day 6 post encapsulation, examination of fresh islets under inverted microscope showed that, most islets were regularly shaped with a well-defined smooth appearance and occasional irregular borders (Figure 1). Seven percent of the encapsulated islet population showed signs of very dark tissue located in the center of the islets with sharply demarcating borders from the surrounding islet tissue (Figure 1A and B; Table 1). This central area of necrosis was confirmed by routine histology showing signs of very dark tissue located in the center of the islets with sharply demarcating borders (data not shown). IGF-II culture supplementation, at concentrations of 100 and 500 ng/mL, significantly reduced the percentage of encapsulated islets with central necrosis in a dose-dependent manner: 46% ($p < 0.01$) and 69% ($p < 0.001$) reduction respectively (Figure 1C and D; Table 1). The presence of necrosis was associated with islet size (Table 1), being more prevalent in islets larger than 200 μm .

Islet viability

Fluorescence microscopy was used to determine the proportion of dead cells within encapsulated islets, six days post-encapsulation. The viability of encapsulated islets cultured without IGF-II was greatly reduced as shown by the high number of dead cells within the islets (Figures 2A). The number of dead cells was reduced when islets were cultured with IGF-II (Figure 2B). IGF-II supplementation significantly improved the percentage of viable encapsulated islets in a dose-dependant manner (Figure 3A). A 51%

and 83% increase in the percentage of viable encapsulated islets was observed when the cultured media was supplemented with 100 and 500 ng/mL IGF-II respectively (Figure 3A; $p = 0.052$ and $p < 0.01$ respectively).

XTT assay

The XTT assay confirmed the results of the fluorescence microscopy experiments. In this assay, the production of formazan by mitochondria indicates that the islet cells are viable and metabolically active. Six days post-encapsulation, formazan production was significantly improved in a dose-dependent manner by IGF-II supplementation (Figure 3B). A 44% and 51% increase in formazan production was observed in encapsulated islet cultured with 100 and 500 ng/mL IGF-II respectively (Figure 3B; $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively).

Apoptosis studies

The TUNEL assay was used to evaluate islet cell apoptosis on day 6 of post-encapsulation. Without IGF-II supplementation, a large number of islet cells showed evidence of apoptosis (Figure 4A). Most TUNEL-positive cells were located in the inner 80% of the islet, suggesting that these were primarily β -cells. Labelling of islets for insulin confirmed that most apoptotic cells were β -cells (data not shown), although, as expected, some TUNEL-positive cells did not show immuno-reactivity for insulin. IGF-II supplementation significantly reduced the number of TUNEL-positive cells (Figure 4B) and the apoptotic index in a dose-dependent manner (Figure 5). A 20, 29 and 33% reduction in the apoptotic index was observed in encapsulated islets cultured with 50, 100

and 500 ng/mL IGF-II respectively (Figure 5; $p < 0.05$, $p < 0.005$ and $p < 0.001$ respectively).

Perfusion

Six days post-transplantation, the glucose stimulation of encapsulated islet cells caused biphasic insulin secretion with a SI of 2.1 ± 0.3 and 8.6 ± 2.1 with theophylline. Following culture with IGF-II, an increase in SI between 38 to 67% was observed (SI of 2.9 ± 1.0 , 3.5 ± 0.8 and 3.2 ± 1.3 for 50, 100 and 500 ng/mL IGF-II respectively). When the culture media was supplemented with 100 or 500 ng/mL IGF-II, the function of the surviving islets was optimal since the SI with theophylline was 11.3 ± 2.3 and 10.6 ± 3.5 respectively as opposed to 9.1 ± 1.9 for the 50 ng/mL IGF-II. Notably, this assay of dynamic perfusion measures the function of surviving encapsulated islets and do not provide any information on the number of dead or living islets.

In vivo studies

Islets of the same size were used for transplant experiments since both experimental groups (incubations with and without IGF-II) had similar ratio of islets on islet equivalents (1.25 ± 0.09 and 1.18 ± 0.06 respectively). None (0/12) of the STZ-induced diabetic mice transplanted intraperitoneally with 300 non-encapsulated rat equivalent islets became normoglycemic (data not shown). One (1/12) of the STZ-induced diabetic mice transplanted with 300 non-encapsulated islet equivalents pre-incubated with IGF-II 500 ng/mL became normoglycemic (data not shown).

When, using a minimal mass model, 300 encapsulated islet equivalents not incubated with IGF-II were transplanted into diabetic mice, normoglycemia was induced in

92% (11/12) of recipients (Figure 6A). However, progressive recurrence of hyperglycemia was observed, and only 67% (8/12) and 25% (3/12) remained normoglycemic at 45 and 143 days respectively (Figure 6A). In contrast, when 300 encapsulated islet equivalents incubated with IGF-II were used, 100% (12/12) of recipients became normoglycemic, and 100% (12/12) and 75% (6/8) remained normoglycemic at 45 and 143 days respectively (Figure 6A). From day 143, both groups began to gradually converge and became statistically indistinguishable; so at the end of the study, the percentages of normoglycemic mice were 25% (2/8) in the IGF-II treated group and 0% (0/11) in the control group (Figure 6A). The differences were statistically significant from day 45 to day 143 (Figure 6A; $p < 0.05$). The average blood glucose levels remained normal (< 7 mM) until the end of the study (213 days) in the IGF-II-treated group whereas it progressively increased up to 14.7 ± 1.0 mM at 213 days without IGF-II incubations (Figure 6B). The differences between the two groups were statistically significant from day 21 to day 143 (Figure 6B; $p < 0.05$). Again, after 143 days the two groups began to converge and became statistically indistinguishable (Figure 6B).

When only 150 encapsulated islet equivalents not incubated in IGF-II were used, only 50% (6/12) became normoglycemic and only 33% (4/12) and 8% (1/12) remained euglycaemic at 45 days and 143 days (Figure 6A). The average blood glucose remained over 12 mM throughout the study (Figure 6B). In contrast, after the transplantation of 150 islet equivalents pre-incubated with IGF-II, 100% (11/11) of the recipients became normoglycemic and from day 21 to day 101 more than 80% (8/10) remained so (Figure 6A). At day 143, 50% (5/10) of the recipients were normoglycemic (Figure 6A). The average blood glucose remained within normal limits until day 171, slightly higher than in the group transplanted with 300 IGF-II pre-incubated islet equivalents but significantly

lower than with 150 (or even 300) non IGF-II pre-incubated islet equivalents (Figure 6B). The differences between treatment groups in both parameters (% normoglycemic mice and average blood glucose) were important and significant throughout the study (Figures 6A and B; $p < 0.05$).

DISCUSSION

The present study demonstrated that supplementation of culture media with IGF-II decreases *in vitro* apoptosis and necrosis of microencapsulated rat islets, and improves encapsulated islet cell survival. In addition, islet transplantation studies in STZ-induced diabetic mice confirmed the potential clinical significance of these results. Using a minimal mass model, IGF-II supplementation of standard culture media was shown to allow the normalization of blood glucose in these mice with the transplantation of smaller numbers of encapsulated rat islets than that required in the absence of IGF-II. It is noteworthy that the model used does not involve immune-mediated death of beta cells, so it is impossible to determine from this study if IGF-II treated islets would have any advantage if transplanted in an immune based model of diabetes, such as the NOD mouse.

The results of fresh islet examinations, histological studies, fluorescence microscopy studies with propidium iodide and acridine orange staining, XTT assays and apoptosis studies all indicated that IGF-II supplementation significantly improves *in vitro* encapsulated rat islet cell viability in a dose-dependent manner. This confirms and expands the findings of our previous *in vitro* studies with non-encapsulated hamster islets (24). The latter study showed that the pancreatic ductal epithelium, duct-conditioned medium or IGF-II promotes islet cell survival (24).

There is an experimental advantage to using encapsulated (as opposed to free) islets for *in vitro* viability studies, particularly if islets have to be cultured for long periods. Non-viable free islets disintegrate, and are washed-out during culture medium changes, which are done every second day. As a result, the actual number of dead cells may be

underestimated. Encapsulated islets remain within microcapsules, even when most islet cells are dead. In the present study, islets incubated with or without different concentrations of IGF-II were all encapsulated, allowing for more reliable comparisons between treatment groups.

A dual staining fluorescence method has advantages over the simple trypan blue exclusion technique for viability studies on multicellular three-dimensional structures like islets (31, 32). The former method allows the identification of both living and dead cells, whereas the latter identifies only living cells, which may be misleading if peripheral cells are alive while central cells are dead. In addition, with the former method, dead cells and living cells may be localized within the islets. Results were expressed as a percentage of viable islets defined as an islet with $> 50\%$ of viable cells, because, in culture, islets with $> 50\%$ of dead cells usually do not recover and all cells eventually die. IGF-II supplementation had a dose-dependent protective effect on the viability of islets undergoing the potentially damaging isolation and encapsulation procedures and during culture for 6 days in minimally nutritive conditions (Figure 1, 2 and 3A). These results were confirmed by the XTT assay showing that IGF-II supplementation had a dose-dependent positive effect on encapsulated islet cell survival (Figure 3B).

Apoptosis largely predominated over necrosis. This is in contrast with the findings of De Vos (16), who reported that necrosis has been the principal mechanism of cell death in islets encapsulated in $> 700 \mu\text{m}$ diameter microcapsules. This discrepancy may be explained by microcapsule size. Considering the three-dimensional configuration of microcapsules, the $> 700 \mu\text{m}$ diameter microcapsules used by De Vos are 10 fold larger in

volume than the 300-350 μm diameter microcapsules used in the present study. The use of smaller microcapsules considerably enhances the access of islets to nutrients and oxygen (33). It is noteworthy that, in the present study (Table 1), as well as in the De Vos study (16), central necrosis was located predominantly in larger islets, suggesting that deprivation of nutritional factors causes central necrosis (16). In spite of the damages induced by the encapsulation procedure, after 6 days in culture, the percentage of islets with necrosis was lower (7%) in the current study than that reported by Ilieva et al. (> 15%) in non-encapsulated hamster islets (24). A better *in vitro* survival of encapsulated than non-encapsulated islet cells has been reported by others (9, 34), and previously observed in our laboratory (unpublished data). This may be explained by the formation of a favorable microenvironment in microcapsules. Another potential explanation is a difference between hamster and rat islets. Nevertheless, IGF-II incubations significantly decreased in a dose-dependent manner both the apoptosis and necrosis that occur following the islet isolation and encapsulation procedures and cell culture.

Encapsulated islets had an appropriate response to glucose stimulation with a biphasic insulin secretion that promptly returned to the basal rate on reduction of glucose to the basal level. The signaling pathways of insulin secretion appears to be preserved, at least in part, since in all conditions tested, when the secretagogue theophylline was introduced in the system, encapsulated islets increased their insulin secretion. The SI showed that IGF-II supplementation had a positive effect on encapsulated islet cell function. However, perfusion studies are known not to be predictive of the success of *in vivo* transplantation (35). Therefore, the definitive test for assessing islet function is the result of transplantation into diabetic animals.

The potential clinical significance of the results presented above was confirmed by transplantation studies in diabetic mice. For these *in vivo* studies, we chose to reduce the *ex-vivo* incubation period to a minimum before transplantation, because prolonged culture time reduces islet function. In addition, this corresponds to clinical practice. Therefore, the total IGF-II exposure time was 48 hours, approximately one half before and one half after the encapsulation procedure. UltraCULTURE media was also used to avoid any reduction in encapsulated islet cell viability and to reduce exposure to xenoproteins. The combination of these conditions resulted in the transplantation of viable and functional encapsulated grafts. Since all islet preparations, including controls, were cultured in the same optimal conditions, except for the absence or the presence of 500 ng/mL IGF-II, the positive results represent the benefits provided by IGF-II incubations, in addition to the usual optimal procedures.

The most frequently used numbers of encapsulated islets for transplantation into diabetic mice have been 1000 or 500 (10, 11, 17, 36-40), which corresponds approximately to 40 000 and 20 000 islet equivalents per kg body weight respectively. In the present study, a minimal mass model, *i.e.* 300 and 150 islet equivalents, was used to be able to detect differences over a relatively short period, and to evaluate if the use of IGF-II could allow successful transplantations using a reduced islet cell mass. Without IGF-II incubations, the transplantation 150 encapsulated islet equivalents induced normoglycemia in only 50% of recipients, all of which, except one, presented a recurrence of diabetes within 2 months. Increasing the number of these islet equivalents to 300 allowed normalization of blood glucose in a higher proportion of recipients (92%), and the recurrence of diabetes was delayed but still observed in a progressive number of recipients up to 100% at the end of the study. With IGF-II incubations, the transplantation of 300 islet equivalents induced

normoglycemia in all recipients and maintained normoglycemia up to day 143 in 75% of the recipients. The transplantation of 150 encapsulated islet equivalents induced normoglycemia in all recipients with only two recurrences up to 101 days post transplantation and 50% remaining euglycaemic at day 143. From day 73 to day 101, the percentage of normoglycemic mice was significantly higher in the group treated with 150 IGF-II incubated islet equivalents than in the one treated with 300 non IGF-II incubated islet equivalents. The average blood glucose levels inversely paralleled these results. Therefore, IGF-II incubations decreased by more than a half the number of donors/pancreases required to inducing normoglycemia in diabetic mice.

The prolonged effect of IGF-II on islet survival could be explained either by a better preservation of the initial islet cell mass or by a proliferative or a functional component that allows 150 islet equivalents treated with IGF-II to perform better than 300 untreated islet equivalents. We believe that the former explanation is more likely for two reasons: 1- the 4 curves (of both parameters, percentage of normoglycemic mice and average blood glucose) are relatively parallel, suggesting that the speed of cell death/proliferation is similar; 2- it is unlikely that *in vitro* 48 hours incubations have a continuous *in vivo* proliferative effect many weeks after transplantation. However, further studies are required to better understand the mechanisms of such an important effect.

Successful human non-encapsulated islet transplantations have required 2 donor pancreases for most recipients, which represents an average total transplanted graft of 12 000 islet equivalents/kg body weight (2, 3). A much larger number of encapsulated islets than non-encapsulated islets have been required to normalize blood glucose. For example, 15 000-50 000 encapsulated islet equivalents/kg body weight have been required in mice

(10, 11, 17), rats (8, 9, 16), dogs (13, 14) and monkeys (12). Using IGF-II supplementation (and 300 μ m microcapsules), it was possible, for the first time, to reverse hyperglycemia in diabetic mice by transplanting as few as 150 encapsulated islets or 6000 islet-equivalents/kg of body weight. It is noteworthy that the lowest number of non-encapsulated islets, transplanted in a well vascularised site (in contrast to the peritoneum that is used for encapsulated islets), which has been reported to induce normoglycemia in diabetic mice has been 150 (41) (as previously mentioned, most studies have used 500 or 1000 islets). With 150 islet equivalents, a recurrence of hyperglycemia occurred in some of the recipients. However, with 300 islet equivalents (12 000 islet equivalents/kg body weight), which is equivalent to the number of islets/kg used in clinical transplantation, normoglycemia was maintained up to 4 months. In addition, methods could be developed to provide prolonged *in vivo* supply of IGF-II, such as transfection of the IGF-II gene into islets or co-encapsulation of IGF-II producing cells.

IGF-II is a member of the IGF family which include IGF-I, insulin, IGF and insulin receptors as well as IGF binding proteins (42). IGF biological effects are mediated primarily by the type I IGF receptor (IGF-I receptor), which is a tyrosine kinase (43-45). The key signaling pathways so far described to explain enhance proliferation and inhibition of apoptosis through type I IGF receptor are the RAS/RAF/mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway and the PI 3'-kinase pathway (42, 46, 47). We aimed at reproducing conditions that we previously found in the pancreas. We found no IGF-I in duct cell secretions, whereas IGF-II was the principal secretion product of duct cells (24). Therefore, we selected to study IGF-II first. However, it is possible that IGF-I would be as potent or even more potent in our system, since it is likely that the anti-apoptotic effects we observed

are mediated via the type I IGF receptor in β -cells. Indeed, IGF-I has been shown to protect against anoikis (48) and apoptosis (49) and even enhance graft survival in the fetal pancreas transplantation model (50-52). However, further studies are required to better understand the mechanisms of IGF effects on β -cell survival, to see whether IGF-II has novel effects, distinct from those of IGF-I and to determine if IGFs could act synergistically.

In conclusion, the present study demonstrated that a total of 48 hours *in vitro* incubation with IGF-II, in the pretransplantation period, decreases islet cell apoptosis and necrosis in a dose-dependent manner. These IGF-II incubations allowed the normalization of blood glucose in diabetic mice, using less than half the number of encapsulated islets required in the absence of IGF-II. Since apoptosis is more prevalent in dog and human than in rodent islets and some immunosuppressive drugs induce apoptosis, the effect of IGF-II could be even more important for clinical transplantation. Thus, IGF-II supplementation of culture media may decrease the number of pancreases that have to be used to induce normoglycemia in diabetic patients. In addition, since IGF-II has been reported to be the most abundant growth factor released by pancreatic duct cells (24), the present study provides additional support to the concept that the microenvironment provided by the exocrine pancreas plays an important role in islet survival, and that partial or total re-establishment of this microenvironment is a good strategy to promote islet cell survival.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Martin Ménard and Karine Desbiens for technical support. The authors thank Douglas G. Flohr for reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Lacy PE, Kostianovsky M** 1967 Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39.
2. **Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV** 2000 Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-238.
3. **Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovitch A, Elliott JF, Bigam D, Kneteman NM, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AM** 2001 Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50:710-719.
4. **Benhamou PY, Oberholzer J, Toso C, Kessler L, Penfornis A, Bayle F, Thivolet C, Martin X, Ris F, Badet L, Colin C, Morel P** 2001 Human islet transplantation network for the treatment of Type I diabetes: first data from the Swiss-French GRAGIL consortium (1999-2000). *Diabetologia* 44:859-864.
5. **Chick WL, Like AA, Lauris V, Galletti PM, Richardson PD, Panol G, Mix TW, Colton CK** 1975 A hybrid artificial pancreas. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.* 21:8-14
6. **Chick WL, Like AA, Lauris V** 1975 Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* 187:847-849.
7. **Chick WL, Perna JJ** 1977 Artificial pancreas using living beta cells: Effects on glucose homeostasis in diabetic rats. *Science* 197:780-781

8. **Fan MY, Lum ZP, Fu XW, Levesque L, Tai IT, Sun AM** 1990 Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes* 39:519-522.
9. **Lim F, Sun AM** 1980 Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210:908-910.
10. **Lum ZP, Tai IT, Krestow M, Norton J, Vacek I, Sun AM** 1991 Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. *Diabetes* 40:1511-1516.
11. **O'Shea GM, Sun AM** 1986 Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice. *Diabetes* 35:943-946.
12. **Sun Y, Ma X, Zhou D, Vacek I, Sun AM** 1996 Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* 98:1417-1422.
13. **Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Komtebedde J, Smidsrod O, Skjak-Braek G, Espevik T, Heintz R, Lee M** 1992 Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 54:769-774.
14. **Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Heintz R, Yao Q, Yao Z, Zheng T, Merideth N, Skjak-Braek G, Espevik T, et al.** 1993 Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5843-5847.
15. **Rayat GR, Rajotte RV, Ao Z, Korbitt GS** 2000 Microencapsulation of neonatal porcine islets: protection from human antibody/complement-mediated cytotoxicity in vitro and long-term reversal of diabetes in nude mice. *Transplantation* 69:1084-1090.

16. **De Vos P, Van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, de Groot M, Ploeg RJ, De Haan BJ, Van Schilfgaarde R** 1999 Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes* 48:1381-1388.
17. **Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, O'Neil JJ, Weir GC** 2001 Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes* 50:1698-1705.
18. **Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D** 1999 Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* 126:393-398.
19. **Paraskevas S, Duguid WP, Maysinger D, Feldman L, Agapitos D, Rosenberg L** 1997 Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. *Transplant Proc* 29:750-752.
20. **Paraskevas S, Aikin R, Maysinger D, Lakey JR, Cavanagh TJ, Hering B, Wang R, Rosenberg L** 1999 Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-kinases in isolated islets of Langerhans: implications for cultured islet survival. *FEBS Lett* 455:203-208.
21. **Paraskevas S, Maysinger D, Wang R, Duguid TP, Rosenberg L** 2000 Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas* 20:270-276.
22. **Rosenberg L** 1995 In vivo cell transformation: Neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplantation* 4:371-384
23. **Wang RN, Rosenberg L** 1999 Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* 163:181-190.

24. **Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L** 1999 Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 161:357-364.
25. **Petrik J, Arany E, McDonald TJ, Hill DJ** 1998 Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139:2994-3004.
26. **Hill DJ, Strutt B, Arany E, Zaina S, Coukell S, Graham CF** 2000 Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology* 141:1151-1157.
27. **Klock G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, Wohrle M, Federlin K, Zimmermann U** 1994 Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* 40:638-643.
28. **Halle JP, Leblond FA, Pariseau JF, Jutras P, Brabant MJ, Lepage Y** 1994 Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 3:365-372.
29. **Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, Kulseng B, Rokstad AM, Skjak-Brek G, Espevik T** 2001 Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant* 10:263-275
30. **de Vos P, Hoogmoed CG, Busscher HJ** 2002 Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *J Biomed Mater Res* 60:252-259.
31. **Bank HL** 1987 Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia* 30:812-816.

32. **Bank HL** 1988 Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:266-273.
33. **Chicheportiche D, Reach G** 1988 In vitro kinetics of insulin release by microencapsulated rat islets: effect of the size of the microcapsules. *Diabetologia* 31:54-57
34. **Leu FJ, Chen CF, Chiang WE, Chern HT, Shian LR, Chung TM, Wang J, Sun AM** 1992 Microencapsulated pancreatic islets: a pathologic study. *Journal of the Formosan Medical Association* 91:849-858
35. **Ricordi C, Lakey JR, Hering BJ** 2001 Challenges toward standardization of islet isolation technology. *Transplant Proc* 33:1709.
36. **Krestow M, Lum ZP, Tai IT, Sun A** 1991 Xenotransplantation of microencapsulated fetal rat islets. *Transplantation* 51:651-655.
37. **Lanza RP, Kuhtreiber WM, Ecker D, Staruk JE, Chick WL** 1995 Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using uncoated alginate microspheres. *Transplantation* 59:1377-1384.
38. **Lum ZP, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM** 1992 Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules. *Transplantation* 53:1180-1183.
39. **Calafiore R, Baste G, Falorni A, Jr., Avellini L, Brunetti P** 1990 Immunoisolation of porcine islets of Langerhans within algin/polyaminoacidic microcapsules. *Horm Metab Res Suppl* 25:213-214
40. **Weber CJ, Zabinski S, Koschitzky T, Wicker L, Rajotte R, D'Agati V, Peterson L, Norton J, Reemtsma K** 1990 The role of CD4⁺ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. *Transplantation* 49:396-404.

41. **Suzuki K, Bonner-Weir S, Hollister-Lock J, Colton CK, Weir GC** 1998 Number and volume of islets transplanted in immunobarrier devices. *Cell Transplant* 7:47-52.
42. **Winkler R, Pasleau F, Boussif N, Hodzic D** 2000 [The IGF system: summary and recent data]. *Rev Med Liege* 55:725-739.
43. **LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr.** 1995 Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16:143-163.
44. **Rhodes CJ** 2000 IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *J Mol Endocrinol* 24:303-311.
45. **Baserga R, Resnicoff M, D'Ambrosio C, Valentinis B** 1997 The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam Horm* 53:65-98
46. **D'Ercole AJ** 1996 Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25:573-590.
47. **Gallaher BW, Hille R, Raile K, Kiess W** 2001 Apoptosis: live or die--hard work either way! *Horm Metab Res* 33:511-519.
48. **Valentinis B, Reiss K, Baserga R** 1998 Insulin-like growth factor-I-mediated survival from anoikis: role of cell aggregation and focal adhesion kinase. *J Cell Physiol* 176:648-657.
49. **Liu W, Chin-Chance C, Lee EJ, Lowe WL, Jr.** 2002 Activation of phosphatidylinositol 3-kinase contributes to insulin-like growth factor I-mediated inhibition of pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 143:3802-3812.
50. **Desai DM, Adams GA, Wang X, Alfrey EJ, Sibley RK, Dafoe DC** 1999 The influence of combined trophic factors on the success of fetal pancreas grafts. *Transplantation* 68:491-496.

51. **Adams GA, Squiers EC, Maestri M, Lee L, Alfrey EJ, Dafoe DC** 1997 Regimens of IGF-I treatment in fetal pancreas transplantation. *J Surg Res* 68:73-78.
52. **Adams GA, Wang X, Lee LK, Piercy CE, Alfrey EJ, Dafoe DC** 1994 Insulin-like growth factor-I promotes successful fetal pancreas transplantation in the intramuscular site. *Surgery* 116:751-755; discussion 756-757.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1

Photomicrographs showing microencapsulated islet morphology. *(A and B)* Microencapsulated islets cultured without IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the presence of dark central areas of cell necrosis. Original magnification 100 X. *(C)* Same as A and B. Original Magnification 40 X. *(D and E)* Microencapsulated islets cultured with 100 ng/mL of IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the absence of central necrosis. Original magnification 100 X. *(F)* Same as D and E. Original magnification 63 X.

Figure 2

Assessment of microencapsulated islet cell viability using fluorescence microscopy with propidium iodide (dead cells, red) and acridine orange (living cells, green) staining. *(A)* Microencapsulated islets cultured without IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the presence of numerous dead cells (red) at the periphery of the islets. Original magnification 100 X. *(B)* Microencapsulated islets cultured in presence of 100 ng/mL IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the presence of a small number of dead cells at the periphery of islets. Original magnification 100 X.

Figure 3

Evaluation of microencapsulated islet viability. Islets were cultured in minimally nutritive (serum-free) media for a prolonged period. *(A)* Quantitative assessment of islet cell viability using acridine orange (AO) and propidium iodide (PI) staining. Six days post-encapsulation, the percentage of viable islets was evaluated under fluorescence microscope. Experiments were performed on 5 different islet preparations ($n = 5$). Data are presented as

mean \pm SEM. * $p < 0.01$ vs. 0 ng/mL IGF-II. † $p < 0.05$ vs. 50 ng/mL IGF-II. **(B)** Quantitative assessment of islet function using the XTT assay, six days post-encapsulation. Experiments were performed on 5 different islet preparations ($n = 5$). Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. 0 ng/mL IGF-II. † $p < 0.01$ vs. 0 ng/mL IGF-II.

Figure 4

Photomicrographs of microencapsulated islet cell apoptosis. The apoptotic nuclei are stained in red. **(A)** Microencapsulated islets cultured without IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the large number of apoptotic nuclei. Original magnification 1000 X. **(B)** Microencapsulated islets cultured with 500 ng/mL of IGF-II, on day six post-encapsulation. Note the vast majority of non-apoptotic nuclei. Original magnification 1000 X.

Figure 5

Quantitative assessment of microencapsulated islet cell apoptosis. Islets were cultured in minimally nutritive (serum-free) media for a prolonged period. Six days post-encapsulation, islets undergoing apoptosis were identified by a TUNEL assay to calculate an apoptotic index (36). Experiments were performed on 5 different islet preparations ($n = 5$). Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. 0 ng/mL IGF-II. † $p < 0.005$ vs. 0 ng/mL IGF-II. ‡ $p < 0.0005$ vs. 0 ng/mL IGF-II. || $p < 0.05$ vs. 50 ng/mL IGF-II.

Figure 6

Effect of IGF-II on *in vivo* encapsulated islet survival after transplantation into diabetic mice. Following isolation, islets were cultured in UltraCULTURE media with or without IGF-II, until transplantation within 24 hours post encapsulation. These results show the

benefits provided by IGF-II supplementations over the optimal usual conditions. Closed squares, 300 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II; closed diamonds, 300 islet equivalents cultured without IGF-II; open triangles, 150 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II; open circles, 150 islet equivalents cultured without IGF-II. **(A)** Percentage of normoglycemic mice following transplantation of 300 or 150 islet equivalents. At day 0, $n = 11$ for 150 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II, and $n=12$ for 300 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II and 150 and 300 islet equivalents cultured without IGF-II. * $p < 0.05$ vs. 500 ng/mL IGF-II. † $p < 0.05$ vs. 150 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II. **(B)** Mean blood glucose levels following transplantation of 300 or 150 islet equivalents. At day 0, $n = 11$ for 150 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II, and $n=12$ for 300 islet equivalents cultured with 500 ng/mL IGF-II and 150 and 300 islet equivalents cultured without IGF-II. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. 500 ng/mL IGF-II.

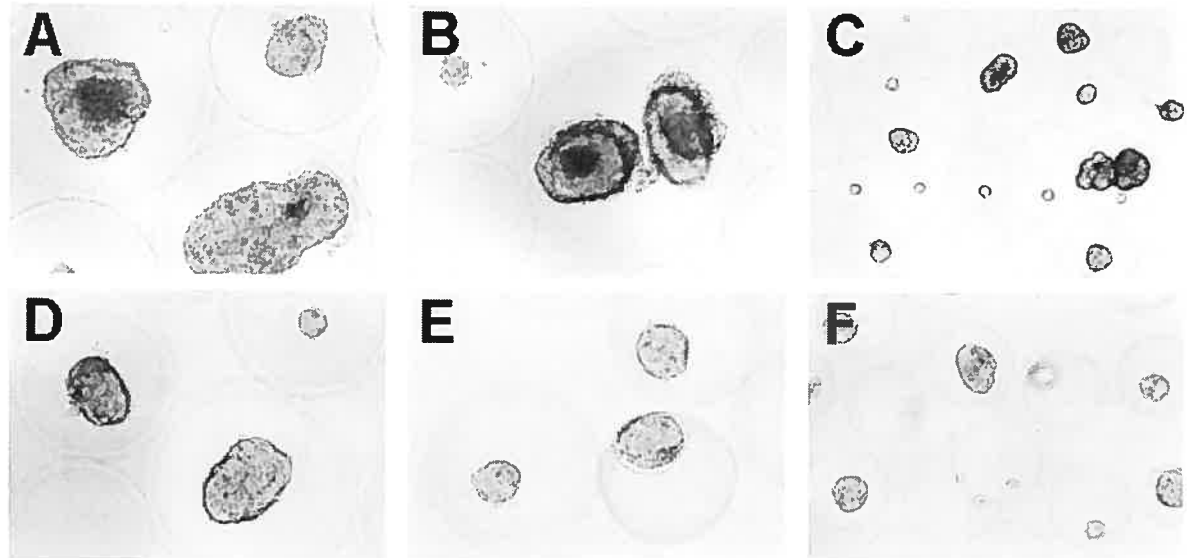
FIGURES**Figure 1**

Figure 2

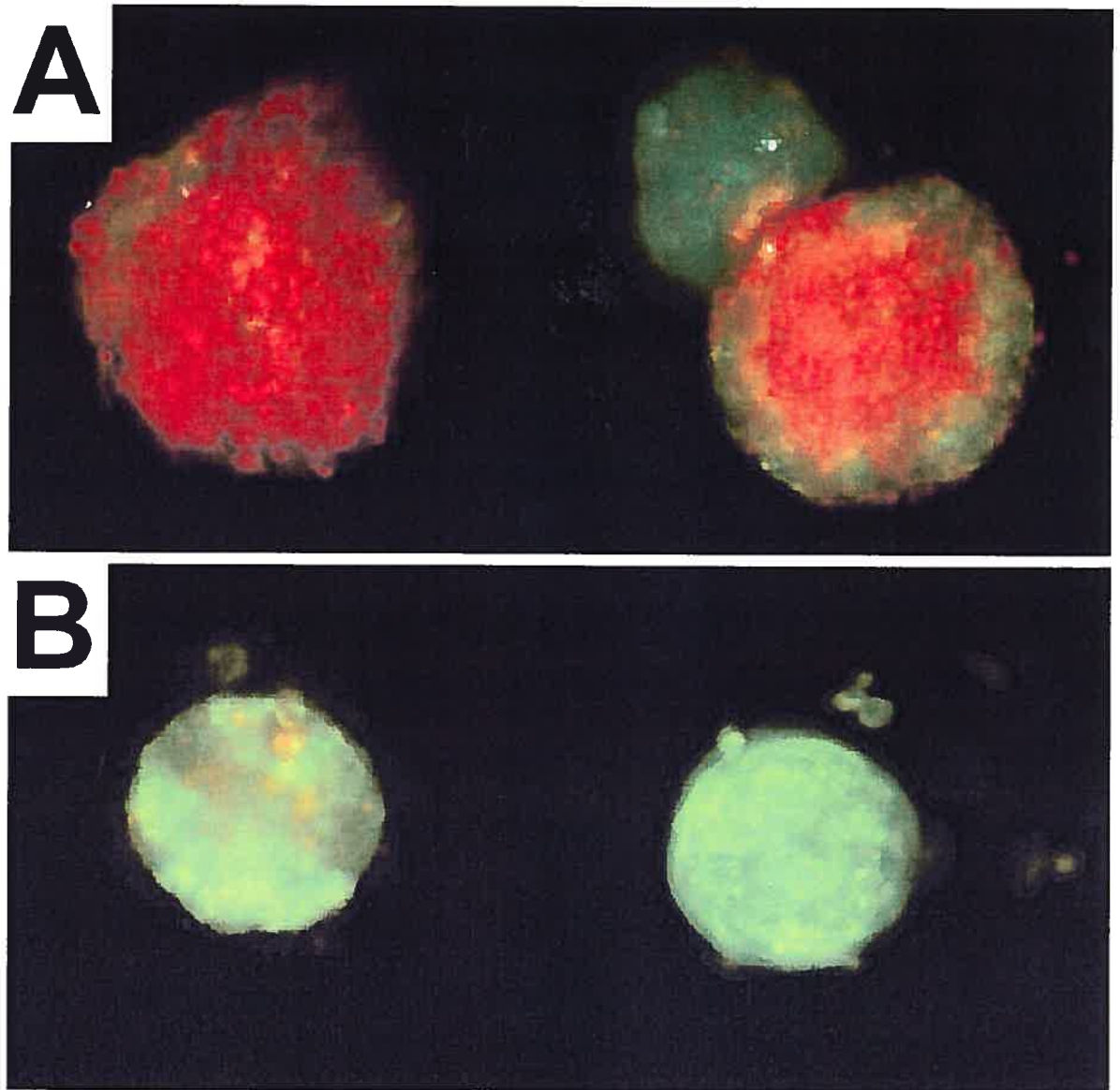


Figure 3

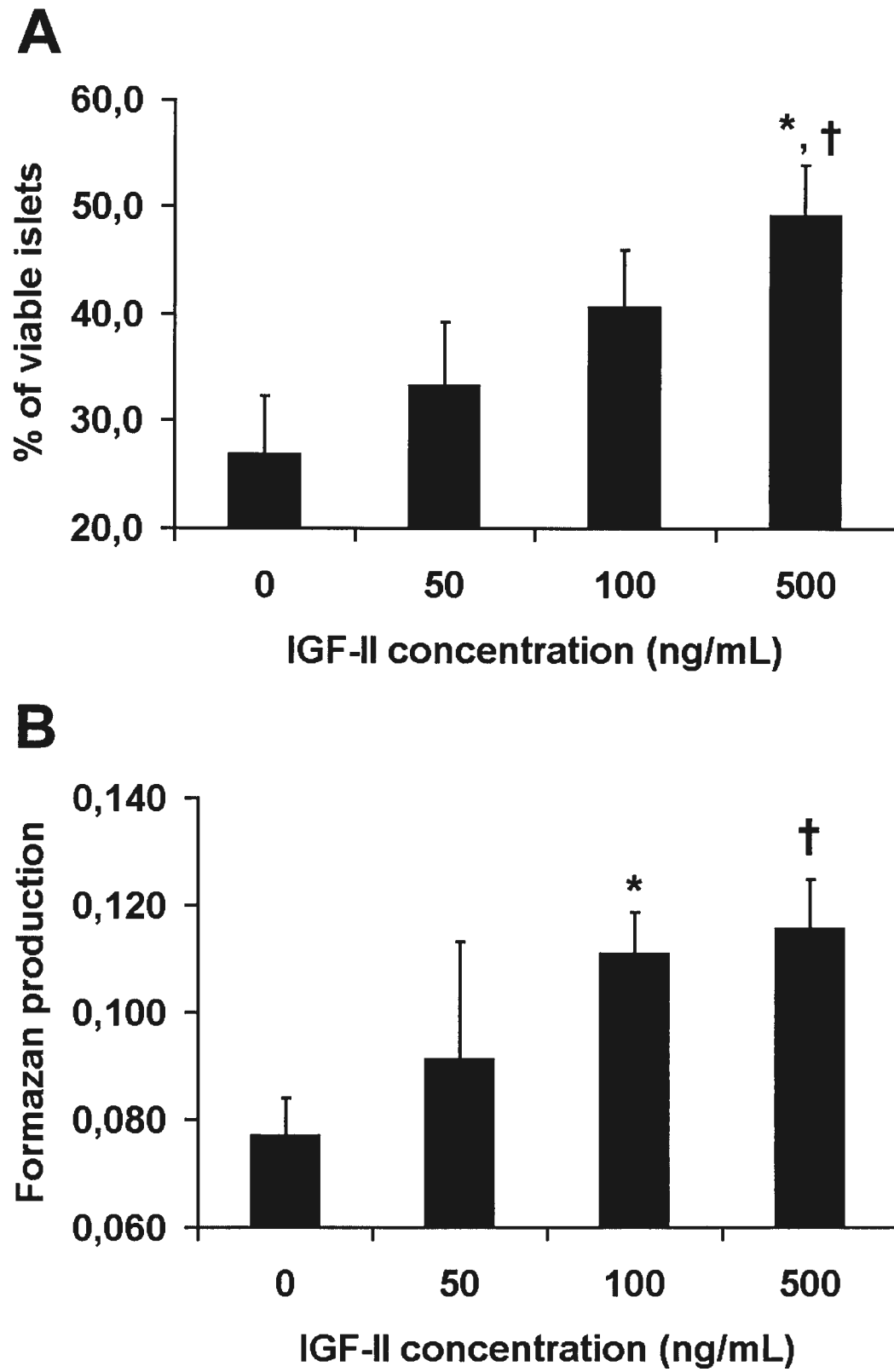


Figure 4

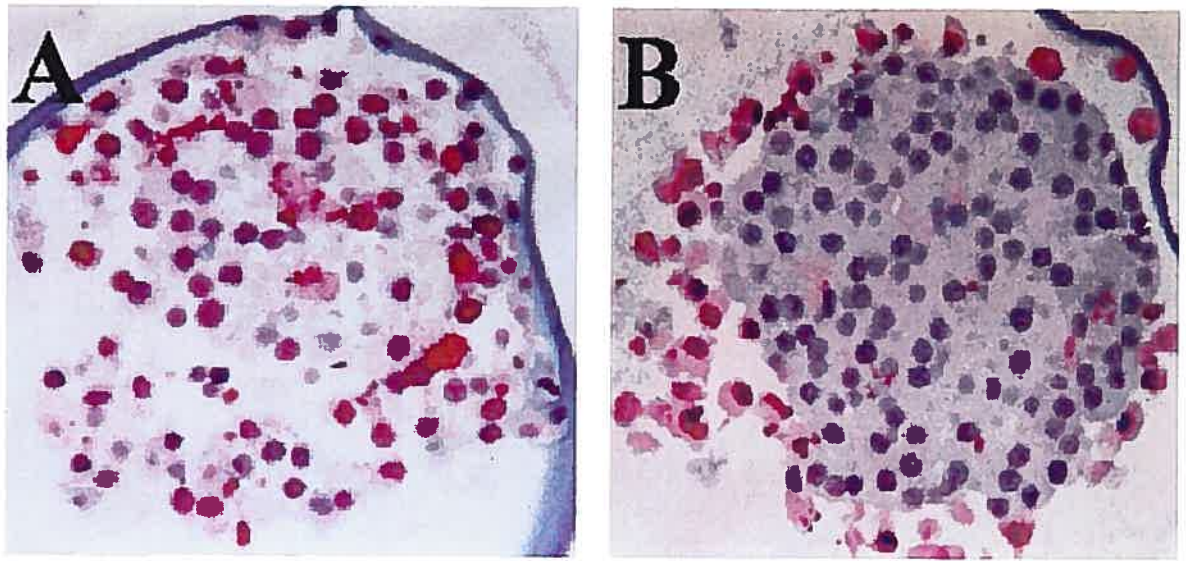


Figure 5

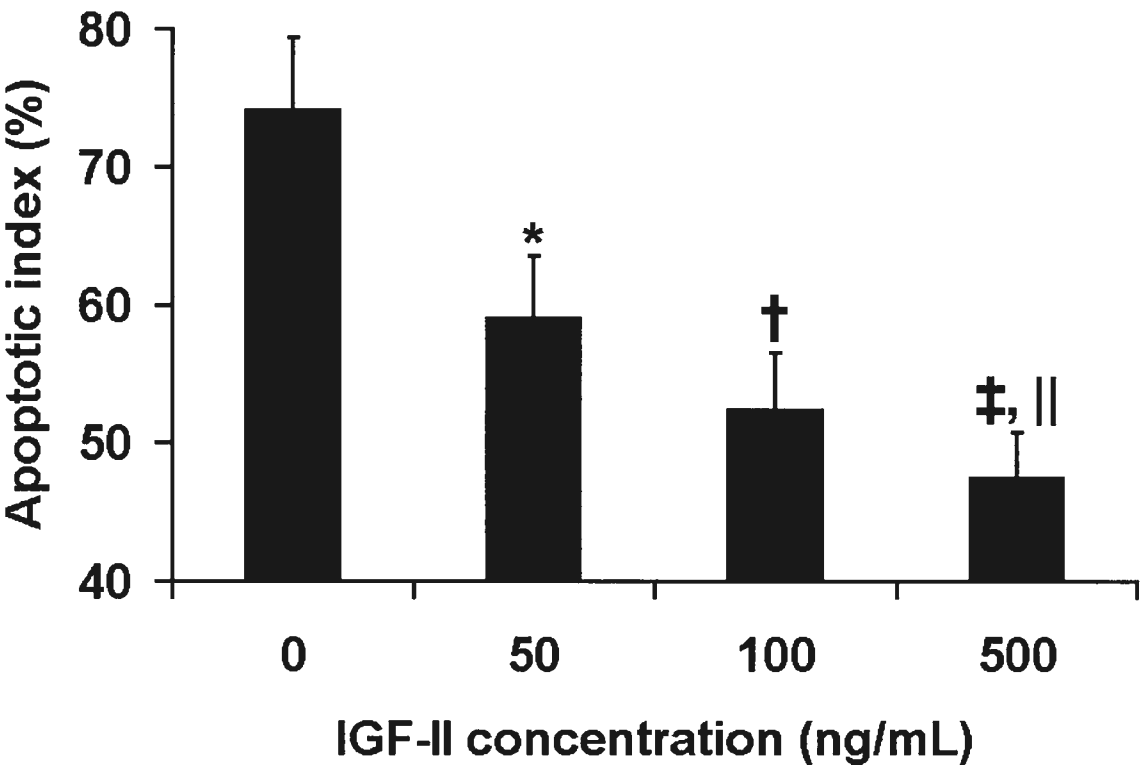
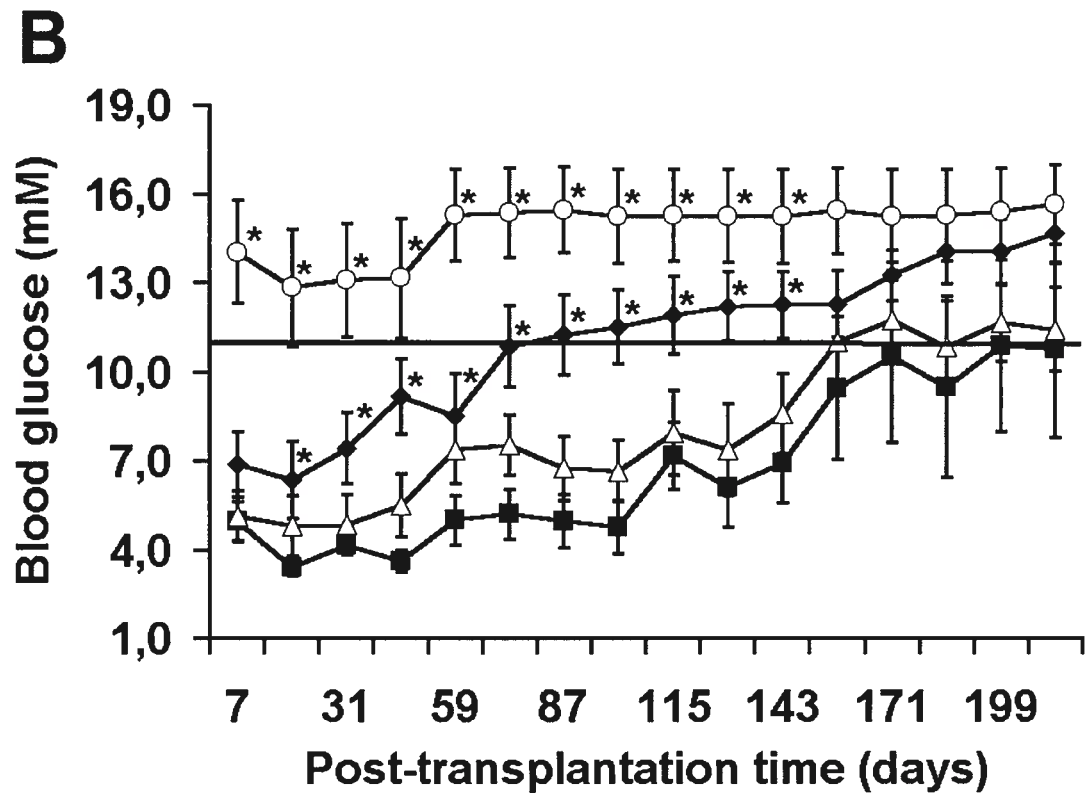
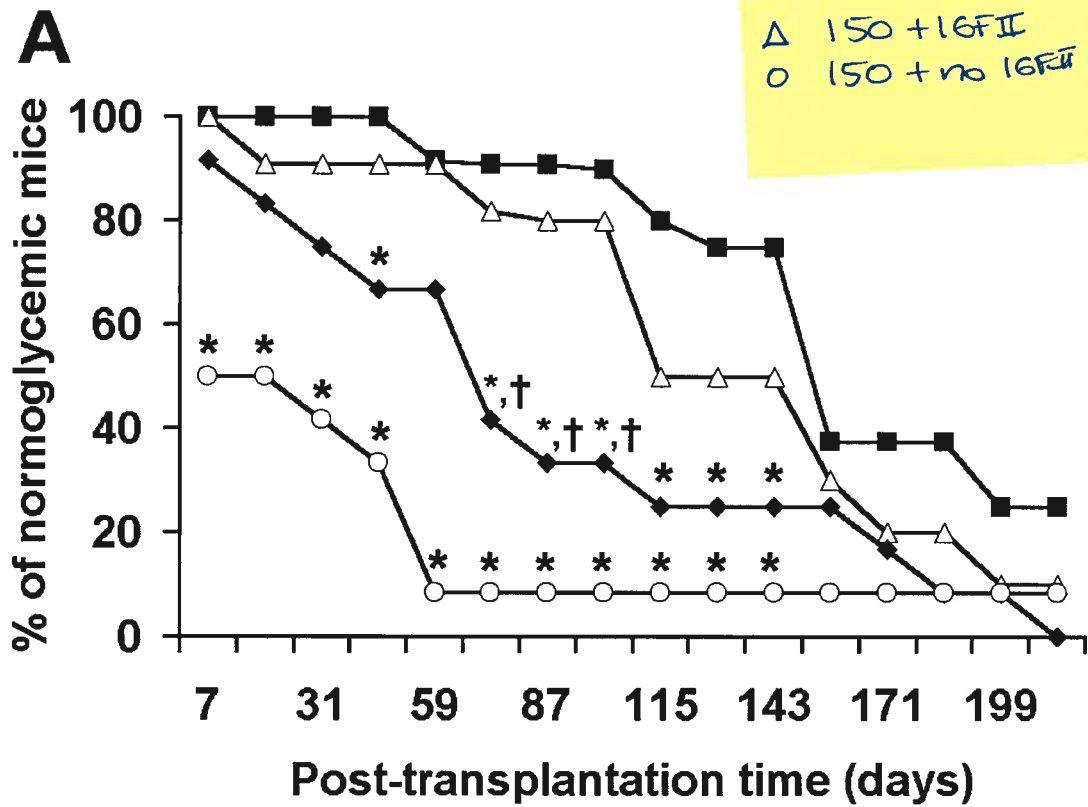


Figure 6



TABLE

Table 1 Effect of IGF-II supplementation on microencapsulated islet morphology, on day six post-encapsulation ^A.

IGF-II supplementation (ng/mL)	# of islets (mean ± SEM.)	Percentage of islets with central necrosis (mean ± SEM.)	Diameter (μm)		
			Non-necrotic islets (mean ± SEM.)	Necrotic islets (mean ± SEM.)	Necrotic area (mean ± SEM.)
0	155 ± 8	7.0 ± 0.7	112.5 ± 5.5	205.5 ± 9.3	77.8 ± 10.5
50	170 ± 12	7.5 ± 0.9	112.9 ± 3.4	207.5 ± 6.3	72.0 ± 9.7
100	166 ± 3	3.8 ± 0.6†	114.6 ± 3.8	224.8 ± 21.0	87.7 ± 13.2
500	159 ± 7	2.2 ± 0.3‡	110.0 ± 2.6	227.3 ± 11.9	77.9 ± 9.0

^A Experiments were performed on 5 different islet preparations (n = 5); † $p < 0.01$,

‡ $p < 0.001$ vs. 0 ng/mL.

E. DISCUSSION GÉNÉRALE

E.1. Biocompatibilité des îlots microencapsulés

Bien que la faisabilité de la transplantation d'îlots microencapsulés ait été démontrée, des problèmes fondamentaux persistent puisque la survie du greffon varie de quelques jours à quelques années. Ces variations dans le taux de succès sont généralement attribuées à des différences dans la biocompatibilité des microcapsules utilisées. La problématique de la biocompatibilité, en particulier l'interaction entre l'hôte et les biomatériaux, est donc bien réelle et elle est toujours au coeur des priorités de recherche. Quelques études antérieures, faites sur la biocompatibilité des microcapsules, avaient pour but d'analyser le degré de la réaction péricapsulaire ^{51,83,87,93,100,117,196}. Ces analyses étaient effectuées après le constat d'échec d'une transplantation, de sorte que les caractéristiques de la réaction péricapsulaire, en particulier son évolution dans le temps, étaient inconnues.

En utilisant deux modèles différents, nous avons été les premiers à étudier l'évolution des mécanismes moléculaires et cellulaires de la réaction de l'hôte contre les microcapsules (Chapitres D.1 et D.2). L'utilisation du modèle d'implantation de microcapsules dans le péritoine nous a permis de démontrer, sur une période de quelques heures à quelques jours, l'implication des cytokines proinflammatoires et fibrogéniques (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et TGF- β_1) (Chapitres D.1 et D.2). Nous avons aussi confirmé le rôle des macrophages dans la réaction de l'hôte contre les microcapsules (Chapitres D.1 et D.2). Comme le démontre nos études sur l'évolution des réactions moléculaires et cellulaires, la réaction de l'hôte contre les microcapsules n'est pas un processus statique mais plutôt dynamique (Chapitres D.1 et D.2). Selon King ¹⁰⁴, la réaction de l'hôte contre les microcapsules serait complète à l'intérieur d'une semaine, d'où l'importance d'étudier les caractéristiques de cette réaction durant les premiers jours et même les premières heures. Nous avons démontré que l'initiation des réactions moléculaires et cellulaires se fait dès les premières heures (3 à 17 heures) suivant l'implantation de microcapsules (Chapitre D.2). Ces résultats confirment et complètent les observations faites par De Vos ¹³⁰. En effet, ce dernier a observé une réponse tissulaire dynamique dans la période post-transplantation

immédiate (1 jour à 7 jours) caractérisée par l'adsorption de protéines à la surface des microcapsules et le recrutement de macrophages, granulocytes et de fibroblastes ¹³⁰. Contrairement aux observations de King ¹⁰⁴, nos résultats démontrent que le processus dynamique de la réaction de l'hôte contre les microcapsules persiste bien au-delà de la première semaine (14 à 60 jours). Ainsi, par l'utilisation du modèle d'implantation de microcapsules dans les coussins graisseux épидидymaires, nous avons démontré que la réaction de l'hôte contre les microcapsules évolue vers une réaction de fibrose (Chapitre D.1). La fibrose péricapsulaire est caractérisée par l'expression de TGF- β_1 , la présence de cellules géantes et le recrutement de fibroblastes (Chapitre D.1). Cette différence peut être expliquée par l'utilisation de sites d'implantation différents puisque la biocompatibilité dépend de plusieurs facteurs comme l'espèce animale et le site d'implantation ^{61,86,197}.

À la lumière de nos résultats et des résultats disponibles dans la littérature nous pouvons proposer un modèle en quatre étapes pour expliquer la réaction de l'hôte contre les îlots microencapsulés. La première étape de la réaction est induite par la procédure d'implantation plutôt que par la présence des microcapsules. Nous avons démontré que la procédure d'implantation (injection d'une solution saline seulement) se traduisait par l'activation non-négligeable du site de transplantation (Chapitre D.2). Bien que la procédure d'implantation soit minimalement invasive, elle implique le bris de tissus et de collagène. Le saignement et la phase de réparation tissulaire introduisent des facteurs sériques et des protéines bioactives (trombine, fibronectine, le fibrinogène et les molécules du complément) qui ont un effet chimiotactique sur les cellules inflammatoires en particulier les granulocytes et les macrophages ^{133,198}.

Cette réaction initiale est renforcée par la présence de matériaux étrangers, comme les microcapsules, et s'apparente à une réponse inflammatoire locale caractérisée par le recrutement rapide et ordonné de granulocytes, de macrophages et de lymphocytes. Dans les premières heures, il y aurait adsorption de protéines à la surface des microcapsules. Ceci favoriserait l'activation et le recrutement des granulocytes près des microcapsules. Nous

avons démontré que les neutrophiles sont les premières cellules péritonéales dont le nombre augmente suite à l'implantation de microcapsules (Chapitre D.2). Les neutrophiles et les mastocytes sont les cellules effectrices lors de l'inflammation aiguë qui survient à la suite de l'implantation de biomatériaux ^{198,199}. Ils sécrètent des facteurs chimiotactiques qui sont responsables du recrutement intensif et rapide de leucocytes, en particulier de macrophages, au site d'implantation. L'adhérence des macrophages, facilitée par l'adsorption des protéines à la surface des microcapsules, se fait principalement où il y a des imperfections ¹³⁰. Le rôle des macrophages dans la réaction de l'hôte contre les biomatériaux et le contrôle de l'inflammation chronique est très bien connu ²⁰⁰⁻²⁰². De plus, plusieurs études suggèrent un rôle des macrophages dans la réaction de l'hôte contre les microcapsules ^{115,139,203}. Entre autres, le tissu péricapsulaire est constitué majoritairement de macrophages ^{62,83,84,115,137,139,197,203}. Les macrophages sécrètent des cytokines proinflammatoires de façon à activer les cellules inflammatoires en périphérie des microcapsules. De plus, certains des produits libérés par les macrophages (NO, TNF- α et IL-1 β) induisent la mort des îlots ²⁰⁴⁻²⁰⁸. Après quelques jours, la réaction inflammatoire devient chronique et est caractérisée par le début du recrutement de lymphocytes et la sécrétion de cytokines fibrogéniques (TGF- β_1 et IL-1 β).

La réaction de l'hôte contre le greffon (îlots) se développe après la période post-transplantation immédiate (de quelques jours à quelques semaines) (Chapitre A.4.3.2). Cette réaction immunitaire spécifique est caractérisée par l'implication des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. L'importance des voies de reconnaissance des antigènes (directe et indirecte) sera dictée par la nature du greffon (allogreffe ou xéngreffe). Dans le contexte d'une allogreffe, la reconnaissance directe des antigènes est la voie principale par laquelle les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺ sont impliqués dans le rejet (Chapitre A.4.3.2.1). Ainsi, les lymphocytes T CD4⁺ du receveur interagissent directement avec les APCs du greffon (via les molécules du CMH de classe II) et les lymphocytes T CD8⁺ interagissent directement avec les cellules du greffon (via les molécules du CMH de classe I). La microencapsulation adéquate des îlots empêche le contact direct cellule-cellule et donc la reconnaissance directe des antigènes par les lymphocytes T. Dans le contexte d'une xéngreffe, le rejet est effectué par les lymphocytes T CD4⁺ indépendamment des

lymphocytes T CD8⁺ ²⁰⁹. Les lymphocytes T CD4⁺ sont sensibilisés par des antigènes relâchés par le greffon et qui sont captés et présentés par les APCs du receveur (Chapitre A.4.3.2.2). Bien que l'encapsulation empêche la reconnaissance directe, la membrane semi-perméable des microcapsules ne prévient que partiellement la relâche des antigènes et des protéines qui proviennent des îlots. Une autre préoccupation importante vient du fait que les îlots transplantés sont susceptibles d'être détruits par la récurrence du processus auto-immun à l'origine du diabète de type 1 ²⁰⁹⁻²¹¹. Contrairement à la pathogenèse initiale, qui nécessite la participation des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺, la récurrence de la maladie auto-immune semble être dépendante des lymphocytes T CD4⁺ et indépendante des lymphocytes T CD8⁺ ²⁰⁹. Une situation similaire à la xénogreffe survient puisque les lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs sont sensibilisés par les antigènes relâchés par les cellules β des îlots transplantés (reconnaissance indirecte des antigènes captés et présentés par les APCs du receveur; Chapitre A.1.1.1). La similarité des antigènes relâchés par les cellules β transplantées avec les autoantigènes responsables du développement initial du diabète de type 1, influencera la récurrence du processus auto-immun. Il est important de noter, encore une fois, que la membrane semi-perméable des microcapsules ne prévient que partiellement la relâche des antigènes qui proviennent des îlots transplantés.

Finalement, comme les microcapsules persistent au site de l'inflammation, une réaction de fibrose se développe après plusieurs semaines. Certains macrophages tentent de dégrader les microcapsules et fusionnent pour former des cellules géantes. D'autres sécrètent des cytokines fibrogéniques comme le TGF- β_1 . Les cytokines fibrogéniques favorisent le recrutement de fibroblastes responsables de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène ^{134,135,144}. Le résultat final de la réaction de fibrose est la production d'un tissu très dense et métaboliquement actif au pourtour des microcapsules ^{104,105,143}. Cette barrière physico-métabolique empêche la libre diffusion des molécules essentielles à la survie des îlots (Chapitre A.4.3.4.2.1).

La biocompatibilité des microcapsules est grandement influencée par la pureté des polymères utilisés (Chapitre A.4.3.1.1). L'obstacle principal qui limite l'application clinique de la transplantation des îlots microencapsulés est le manque de polymères dont la

pureté est adéquate (« clinical-grade ») ²¹². L'alginate est le biomatériau de choix pour l'encapsulation à cause de ses caractéristiques intrinsèques (Chapitre A.3.2). Cependant, la provenance et les techniques de préparation de l'alginate font en sorte que la pureté soit inadéquate pour la transplantation (Chapitre A.4.3.1.1). Bien qu'ils existent plusieurs méthodes de purification (méthodes maison), aucune méthode n'est parfaite, standardisée et reproductible (Chapitre A.4.3.1.1). Un consensus sur l'élaboration d'un protocole de purification standardisé est essentiel afin d'éviter la variabilité de la pureté du matériau de base ²¹². La biocompatibilité semble être inversement proportionnelle à la quantité de PLL utilisée dans la fabrication des microcapsules (Chapitres A.4.3.1.2 et D.4). Ceci explique l'intérêt renouvelé pour les microcapsules planaires (sans PLL) ⁶⁷. Toutefois, la biocompatibilité est aussi associée à des imperfections individuelles ^{39,62}, qui peuvent survenir lors de la fabrication et/ou *in vivo*. Comme pour la production d'alginate purifié, il est nécessaire d'obtenir un consensus sur un protocole de fabrication et idéalement d'adopter une méthode entièrement automatisée ce qui permettrait d'améliorer la reproductibilité et la qualité des microcapsules ²¹².

Toutes les modifications introduites pour améliorer la biocompatibilité, telle que les protocoles consensus pour la purification et pour la fabrication des microcapsules, devront être évaluées de façon méticuleuse et séquentielle. L'évaluation *in vitro* de la composition et de la surface des microcapsules à l'aide des nanotechnologies (spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse ionique, spectroscopie photoélectronique par rayon X, spectroscopie par transformée de Fourier, etc.) devrait constituer la première étape d'un processus de contrôle de qualité ^{212,213}. De plus des études *in vitro* sur la fonction (étude de périfusion) et la viabilité des îlots devront être effectuées afin d'évaluer l'interaction entre les biomatériaux et le greffon. Par la suite, l'évaluation *in vivo* de la biocompatibilité devrait être faite en tenant compte de **1**- l'interaction entre l'hôte et les biomatériaux, **2**- l'interaction entre l'hôte et le greffon. La connaissance et l'utilisation adéquate et séquentielle des différents modèles animaux sont essentielles ¹⁰⁸. Par exemple, l'utilisation d'un modèle syngénique permet d'évaluer l'interaction entre l'hôte et les biomatériaux sans les effets confondants du rejet de greffe. L'analyse de la cinétique des réactions moléculaires et cellulaires pourrait devenir un élément diagnostique permettant de qualifier une préparation de microcapsules. L'utilisation de la génomique et de la protéomique devrait faciliter ce type d'analyse en donnant une vue d'ensemble

complète. De plus, comme l'initiation de la réponse inflammatoire est indépendante de la présence des microcapsules et dépend de la procédure d'implantation, l'analyse de la cinétique des réactions moléculaires et cellulaires permettrait d'élaborer des stratégies pharmacologiques spécifiques et temporaires afin de supprimer l'activité des cellules inflammatoires. Par la suite, l'utilisation des modèles allogéniques et xénogéniques pourrait permettre la détermination du niveau de protection contre le rejet offert par les microcapsules. Finalement des études chez des mammifères supérieurs (chien, cochon, singe) devront être réalisées afin d'évaluer l'applicabilité et l'adaptabilité (« upscaling ») de la méthode pour une éventuelle utilisation chez l'humain.

E.2. Perméabilité des microcapsules

Sur le plan de la biocompatibilité, l'importance d'un processus de contrôle de qualité a déjà été discutée (Chapitre E.1). Des changements mineurs dans la technique de fabrication des microcapsules peuvent entraîner des changements majeurs sur le plan des propriétés comme la résistance à la dégradation mécanique et la perméabilité. Par exemple, les modifications pour augmenter la stabilité des microcapsules se traduisent généralement par une diminution de la perméabilité et vice versa (Chapitre A.4.2). Il est donc nécessaire de posséder des techniques d'évaluation des propriétés des microcapsules et de les utiliser systématiquement afin de caractériser chaque préparation de microcapsules.

Différentes approches peuvent être utilisées pour déterminer le SDM des microcapsules. La mesure de la diffusion (entrée ou sortie) de molécules ^{78,79,214}, la mesure de la diffusion de molécules encapsulées ²¹⁵ et la mesure de la diffusion de protéines dérivées de cellules encapsulées ⁸⁰ sont des approches couramment utilisées mais qui présentent plusieurs limitations : **1-** faible sensibilité, **2-** limitation du nombre de molécules utilisées, **3-** incapacité de discriminer l'absorption de l'adsorption et **4-** limitation du nombre de microcapsules étudiées. Par opposition, la chromatographie par exclusion de taille est une méthode d'évaluation du SDM des microcapsules qui possède plusieurs avantages (Chapitres A.4.2.2 et D.3). Par exemple, elle permet l'utilisation d'une gamme complète de marqueurs pour évaluer de façon précise le SDM d'une population de microcapsules. Bien qu'ils existent des méthodes afin de caractériser la perméabilité et le SDM des microcapsules de taille standard ^{76,78,81}, très peu de méthodes ont été validées pour

caractériser les propriétés de très petites microcapsules (diamètre $< 350 \mu\text{m}$)⁸⁰. Nous sommes les premiers à avoir validé l'utilisation de la chromatographie par exclusion de taille pour évaluer le SDM de très petites microcapsules (Chapitre D.3). De plus, nous avons démontré que l'utilisation de protéines était essentielle et complémentaire à l'utilisation de dextrans et permettait, par exemple, de déterminer le comportement (diffusion, adsorption, etc.) d'une protéine d'intérêt. En effet, l'utilisation d'une gamme de protéines, nous a permis de démontrer l'efficacité de cette méthode à discriminer l'absorption de l'adsorption (Chapitre D.3). Par exemple, nous avons démontré que l'insuline diffusait librement à travers la membrane de nos microcapsules, alors que le cytochrome C était adsorbé. L'utilisation de cette technique nous a permis de confirmer que des changements mineurs dans la procédure de fabrication des microcapsules (comme la concentration, le temps d'incubation et le poids moléculaire de la PLL) se traduisaient par une modulation importante du SDM (Chapitre D.3). Cette méthode simple et efficace pourra être utilisée afin d'optimiser les caractéristiques des microcapsules. De plus, elle devrait être intégrée dans un processus de contrôle de qualité.

Quelle est l'importance du SDM sur la survie et sur la fonction des îlots microencapsulés? À la suite de la mise au point de notre technique d'évaluation du SDM, nous avons les outils nécessaires pour répondre à cette question fondamentale (Chapitre D.4). Sur le plan de la viabilité (*in vitro*) et de la fonction (*in vivo*) des îlots microencapsulés, l'utilisation de microcapsules planaires nous a permis de démontrer qu'il n'y avait pas de différence entre un moyen SDM et un grand SDM (Chapitre D.4). Bien que sur le plan de la viabilité *in vitro* (observation de la nécrose au centre des îlots) il n'y a pas de différence entre un petit SDM, un moyen SDM et un grand SDM (Chapitre D.4), des expériences futures devront être faites pour évaluer l'effet d'un petit SDM sur la fonction *in vivo*. La modulation de la perméabilité des microcapsules planaires, comparativement aux microcapsules faites avec de la PLL, est beaucoup plus difficile et limitée. Une façon de réduire la perméabilité des microcapsules planaires est de fabriquer des microcapsules inhomogènes^{39,216,217}. Dans une microcapsule inhomogène, la concentration d'alginate est plus importante en périphérie (près de la surface) qu'au coeur de la microcapsule. Ce phénomène amplifie le gradient de diffusion vers l'intérieure de la microcapsule et par conséquent la perméabilité est réduite.

L'effet du SDM sur l'efficacité de l'immunoprotection reste à être démontré. La reconnaissance directe des antigènes est le mécanisme majeur par lequel s'amorce la réaction immunitaire spécifique qui provoque le rejet d'allogreffe (Chapitre A.4.3.2.1). Récemment, Duvivier-Khali a démontré l'efficacité à long terme de l'immunoprotection des microcapsules planaires dans un contexte d'allogreffe ⁶⁷. Bien qu'aucune évaluation du SDM ait été effectuée, certains indices nous permettent de supposer que les microcapsules planaires utilisées par Duvivier-Khali étaient caractérisées par un moyen SDM. Théoriquement, même avec un moyen ou un grand SDM, il est possible de bloquer les contacts cellules-cellules et ainsi empêcher la reconnaissance directe. Cependant, la réduction du SDM des microcapsules devient essentielle afin de bloquer la réaction immunitaire non spécifique (Chapitre A.4.3.2.3), la réaction immunitaire spécifique par reconnaissance indirecte des antigènes (mécanisme majeur du rejet de xélogreffe; Chapitre A.4.3.2.2) et la récurrence du processus auto-immun à l'origine du diabète de type 1 (qui implique aussi la reconnaissance indirecte des antigènes ²⁰⁹; Chapitre E.1). L'impact d'une réduction du SDM sur la fonction des îlots microencapsulés devra être évalué de façon empirique avec comme unique condition de ne pas diminuer la fonction et la viabilité des îlots microencapsulés. Cependant, il est utopique de penser qu'en ne modulant que le SDM, on pourra empêcher totalement la relâche d'antigènes ou la diffusion de certaines molécules cytotoxiques (cytokines, radicaux libres, etc.), sans nuire à la fonction et la viabilité des îlots transplantés. Par exemple, le SDM ne doit pas empêcher la diffusion de l'insuline qui est nécessaire pour la fonction des îlots bien que l'insuline elle-même soit un autoantigène potentiellement impliqué dans la récurrence du processus auto-immun. Ainsi, dans les cas de transplantation dans des modèles auto-immuns et dans les cas de xélogreffes, la survie à long terme des îlots microencapsulés pourrait s'avérer problématique. Toutefois, des stratégies basées sur la modulation des caractéristiques des microcapsules comme la distance de diffusion et les charges résiduelles à la surface des microcapsules pourraient être envisagées pour résoudre ce problème. De plus, la combinaison de l'immunoisolation et de certaines techniques de manipulation du système immunitaire pourrait s'avérer bénéfique ²¹⁸⁻²²⁰.

E.3. Masse cellulaire transplantée

En plus d'être influencée par la biocompatibilité, la survie limitée du greffon est associée à une diminution de la masse d'îlots microencapsulés transplantés (Chapitre A.5.1). Ce processus d'involution est causé en partie par la nutrition déficiente des îlots microencapsulés (conséquence de l'absence de revascularisation après la transplantation dans le péritoine) et en partie, selon l'hypothèse de Rosenberg ^{23,24}, par l'élimination du support trophique du pancréas (conséquence du processus d'isolement des îlots; Chapitre A.5). La problématique de la diminution de la masse cellulaire transplantée est donc un obstacle majeur à l'application clinique de la transplantation d'îlots microencapsulés. Pour pallier, avec un succès relatif, la diminution de la masse cellulaire transplantée une quantité astronomique d'îlots microencapsulés doit être transplantée ^{53-55,89}, ce qui nous éloigne encore plus de l'application clinique étant donné le problème du manque de donneurs.

Afin d'améliorer la diffusion des éléments essentiels à la survie des îlots microencapsulés, on peut réduire la taille des microcapsules. Par exemple, l'utilisation d'un générateur d'impulsion électrostatique permet la fabrication de très petites microcapsules (diamètre < 350 μm) ⁶⁵. Ceci représente une réduction de près de 300 % en volume (comparativement aux microcapsules standard de diamètre > 500 μm). Théoriquement, on peut réduire d'avantage la taille des microcapsules en formant la barrière semi-perméable directement à la périphérie des îlots (« conformal coating ») ^{39,221}. Le ratio surface/volume est optimal et la vitesse de diffusion des nutriments est presque identique à celle des îlots non encapsulés. Cependant, l'efficacité de cette technique d'encapsulation n'est pas encore déterminée. La diffusion des éléments essentiels à la survie des îlots microencapsulés dépend aussi de la taille des îlots. En effet, nous avons observé une diminution de la masse cellulaire *in vitro* qui s'explique par la nécrose des îlots microencapsulés de grande taille (Chapitres D.4 et D.5). Ces observations sont conformes à des études antérieures démontrant une corrélation entre la taille des îlots microencapsulés et la prédisposition à la nécrose ^{89,173}. À la lumière de ces observations, la taille des îlots microencapsulés semble être un facteur essentiel pour la survie. L'utilisation de greffons composés d'îlots dont le diamètre est < 100 μm pourrait peut-être améliorer la survie *in vivo*.

Plusieurs évidences suggèrent que la perturbation du microenvironnement pancréatique, qui survient lors de l'isolement des îlots, influence négativement la survie cellulaire des îlots (Chapitre A.5.1.2). Certaines observations, obtenues à partir d'expériences *in vitro*, semblent démontrer que la restauration d'une partie du support trophique (coincubation de cellules épithéliales pancréatiques ou coincubation avec leurs sécrétions dont l'IGF-II) permet de maintenir ou d'améliorer la qualité de la masse cellulaire (Chapitre A.5.1.2.2.2). Nous avons été les premiers à reproduire cet effet *in vitro* sur des îlots microencapsulés (Chapitre D.5). En effet, nous avons démontré que l'ajout d'IGF-II permet d'améliorer la survie des îlots microencapsulés lors de la période de culture *in vitro*. Cette amélioration de la survie se fait via la diminution de la nécrose et de l'apoptose (Chapitre D.5). Ces deux mécanismes sont impliqués dans l'involution de la masse cellulaire des îlots et influencent principalement le devenir des cellules β transplantées (Chapitre A.5.1).

Toutefois, l'utilité potentielle de l'IGF-II dans le cadre d'une transplantation d'îlots n'avait pas été étudiée. Nous avons été les premiers à prouver l'importance de la restauration partielle du support trophique sur la fonction *in vivo* des îlots microencapsulés (Chapitre D.5). Ainsi, l'IGF-II provoque l'amélioration de la qualité de la masse cellulaire *in vitro* et ceci se traduit par une amélioration de la fonction des îlots microencapsulés *in vivo*. Par exemple, 100 % des souris transplantées avec 150 îlots équivalents préincubés avec IGF-II sont devenues normoglycémiques et l'étaient encore après 101 jours. Par comparaison, en absence d'IGF-II, 50 % des souris transplantées avec 150 îlots équivalents sont devenues normoglycémiques et à 2 mois, toutes les souris, sauf une, présentaient une récurrence du diabète. Sur une période d'environ un mois, le pourcentage de souris normoglycémiques était plus élevé dans le groupe de souris transplantées avec 150 îlots équivalents préincubés avec IGF-II que dans le groupe de souris transplantées avec 300 îlots équivalents préincubés en absence d'IGF-II. Par conséquent, l'ajout d'IGF-II *in vitro* permet de réduire de moitié le nombre d'îlots nécessaires pour induire la normoglycémie chez la souris. Si l'on transpose ces résultats chez l'humain, cela veut dire que l'ajout d'IGF-II pourrait permettre de réduire de moitié le nombre de donneurs/pancréas nécessaires pour réaliser une transplantation. Ainsi, la restauration du support trophique pourrait permettre d'atteindre l'objectif ultime du ratio 1 pancréas/receveur (actuellement le groupe d'Edmonton utilise au minimum 2 pancréas/receveur ¹⁷).

Comment expliquer l'effet prolongé du prétraitement avec l'IGF-II sur la survie *in vivo* des îlots microencapsulés? Plusieurs explications peuvent être suggérées : **1-** meilleure biocompatibilité, **2-** activation et maintien d'une composante proliférative et fonctionnelle, **3-** meilleure préservation de la masse initiale de cellules β . Premièrement, le prétraitement des îlots avec l'IGF-II améliore la survie en diminuant l'apoptose et la nécrose des îlots microencapsulés (Chapitre D.5). Une diminution de la nécrose pourrait se traduire par une diminution des antigènes relâchés lors de la destruction cellulaire et donc une diminution de la réaction indirecte de l'hôte contre le greffon (via la reconnaissance indirecte des antigènes). Cette explication ne peut être la principale explication puisque le modèle animal utilisé dans notre étude était déficient pour l'immunité acquise (souris *scid* sans lymphocyte T et B). Cependant, elle pourrait bien être valable dans des modèles d'animaux immunocompétents. Par contre, la relâche des produits intracellulaires lors de la nécrose pourrait bien stimuler l'immunité innée (les souris *scid* sont compétentes pour l'immunité innée). La stimulation de l'immunité innée, en particulier les macrophages, pourrait résulter en une réaction inflammatoire spécifique indépendante des lymphocytes (« bystander »). La vérification de cette hypothèse pourrait se faire par des études histologiques pour évaluer et caractériser la réaction péricapsulaire des microcapsules récupérées à la suite du rejet. Deuxièmement, le prétraitement des îlots avec l'IGF-II pourrait activer une composante ou un processus prolifératif et fonctionnel qui persiste dans le temps. Troisièmement, le prétraitement des îlots avec l'IGF-II pourrait tout simplement améliorer la préservation de la masse fonctionnelle des cellules β durant la période post-isolement. Des deux dernières explications, la dernière explication est la plus probable pour deux raisons : **1-** les pourcentages de souris normoglycémiques, dans les groupes traités ou non avec l'IGF-II, décroissent à la même vitesse (les pentes des graphiques sont parallèles) et **2-** après le prétraitement, le surplus d'IGF-II diffuse hors des microcapsules (perte de la stimulation des récepteurs) ce qui fait qu'il est peu probable qu'une incubation ponctuelle d'IGF-II provoque un effet prolifératif continu étalé sur plusieurs semaines.

L'effet bénéfique de l'ajout d'IGF-II durant la période de culture *ex-vivo*, sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés transplantés, démontre tout le potentiel de l'activité des facteurs de croissance sur le maintien de la fonction des îlots microencapsulés. Nos résultats (Chapitre D.5) rejoignent les résultats de Hill ¹⁸². Il a établi un modèle *in vivo*

pour étudier la survie cellulaire des îlots à l'intérieur du pancréas dans la période néonatale. À l'aide de son modèle, il a récemment démontré que l'IGF-II était un facteur de survie capable de réduire l'apoptose induite par l'exposition à des cytokines ^{181,182}. L'identification de l'IGF-II comme un facteur trophique et antiapoptotique important pour les îlots *in vivo*, supporte l'intérêt d'investiguer l'utilisation des facteurs de croissance afin de protéger les îlots transplantés. En outre, Giannoukakis a récemment démontré que le dysfonctionnement des cellules β et l'activation de l'apoptose des cellules β , induits par la cytokine IL-1 β , pouvaient être prévenus par transfection adénovirale de l'IGF-I dans des îlots humains fraîchement isolés ²²². Ces résultats suggèrent que la production locale d'IGF-I est efficace pour maintenir la fonction et promouvoir la survie des îlots autant dans la période pré que post-transplantation ²²². Il est important de rappeler que les effets biologiques de l'IGF-I et de l'IGF-II sont transmis par les mêmes récepteurs (R-I et R-Ins; Chapitres A.5.1.2.3.1 et A.5.1.2.3.2). Par conséquent, l'étude du système IGF et l'étude des voies de signalisation antiapoptotiques et mitogéniques, propres aux cellules β , pourraient permettre l'identification de stratégies pharmacologiques alternatives plus ciblées et efficaces ²²³.

Finalement, nos résultats constituent aussi une preuve de concept qui appuie fortement la recherche sur la restauration permanente du support trophique afin d'améliorer le maintien à long terme de la fonction des îlots microencapsulés transplantés. Comme la coencubation de cellules canaliculaires pancréatiques et des îlots permet de maintenir et d'améliorer la qualité de la masse de cellules β *in vitro* (Chapitre A.5.1.2.2.2), la coencapsulation de cellules canaliculaires pancréatiques et d'îlots pourrait s'avérer une solution intéressante afin de pallier la diminution de la masse cellulaire fonctionnelle observée en post-greffe. La faisabilité de la coencapsulation de deux types cellulaires différents a déjà été démontrée ²¹⁸ (îlots et cellules de Sertoli). Les cellules canaliculaires pancréatiques, en plus de sécréter l'IGF-II, sécrètent d'autres facteurs qui pourraient s'avérer essentiels pour la survie et la fonction des îlots ¹⁷³. De plus, chez l'adulte, la néogenèse des îlots se fait via les cellules canaliculaires ^{170,171}. Par conséquent, les cellules canaliculaires pancréatiques coencapsulées pourraient s'avérer un réservoir de cellules souches accessibles au besoin.

E.4. Autres considérations essentielles pour assurer l'avenir de la transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés

Pourquoi, malgré le potentiel et les avantages théoriques et un grand intérêt, le domaine de la microencapsulation n'a pas encore satisfait les attentes et les promesses? Outre les limitations technologiques et biologiques déjà exposées ci-dessus, des obstacles politiques, éthiques et réglementaires devront être surmontés. Par exemple, le manque de reproductibilité et la reproductibilité incertaine de certaines études prometteuses ^{54,55} font en sorte que la microencapsulation est perçue comme une méthode maison administrée par un groupe sélect de chercheurs. Une plus grande collaboration internationale permettrait de surpasser cet obstacle politique ²¹². Sur le plan éthique, il est important de s'assurer que les patients seront traités avec une technologie éprouvée et sécuritaire sur le plan biologique. Il faut donc s'assurer que les études cliniques soient bien construites et ne présentent aucun risque inutile pour les patients. Des études éthiquement inacceptables, comme celle de Valdes sur la xénotransplantation d'îlots porcins chez des enfants, font courir des risques inutiles aux patients, augmentent injustement les attentes et les promesses et peuvent même empêcher tout progrès dans le domaine d'étude ^{224,225}. La mise sur pied de comités consultatifs d'experts internationaux qui superviseraient d'éventuelles études pilotes sur la transplantation d'îlots microencapsulés permettrait de s'assurer du respect des normes éthiques ²¹². Finalement, l'ajustement des politiques des autorités réglementaires américaines (US Food and Drug Administration, US Pharmacopeia, etc.) en fonction des récents développements scientifiques dans le domaine de l'encapsulation et de la thérapie cellulaire encourage l'élaboration d'études cliniques ²¹². De plus, cet ajustement constitue un pas important vers l'acceptation et la reconnaissance de la transplantation d'îlots microencapsulés comme traitement du diabète de type 1.

F. CONCLUSION

La réflexion et le travail de recherche entrepris pour réaliser les divers objectifs, formulés dans le Chapitre C, ont donné lieu à l'identification d'une série d'obstacles qui limitent l'application clinique de la transplantation d'îlots microencapsulés. En plus de faire progresser les connaissances, la réalisation de ce travail nous a permis de proposer des stratégies et des solutions afin de surmonter ces embûches.

Les études décrites dans les Chapitres D.1 et D.2 nous ont permis de démontrer que la réaction de l'hôte contre les microcapsules est un processus dynamique dont les composantes moléculaires et cellulaires sont modulées dans le temps. Nous avons pu confirmer le rôle des macrophages et des granulocytes et l'implication des cytokines proinflammatoires et fibrogéniques (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et TGF- β_1) dans la pathogenèse de la réaction contre les microcapsules. L'étude décrite dans le Chapitre D.3 nous a permis de valider l'utilisation de la chromatographie par exclusion de taille afin de déterminer le SDM de nos très petites (diamètre < 350 μ m) microcapsules. Nous avons tous les outils nécessaires afin de déterminer le SDM optimal pour la survie et la fonction des îlots. L'étude décrite dans le Chapitre D.4 nous a permis de démontrer, à l'aide de microcapsules planaires, que la viabilité des îlots microencapsulés n'est pas affectée par le SDM dans les valeurs étudiées. Nos travaux suggèrent qu'à des concentrations élevées (0.08 %), la PLL a un effet toxique directe sur l'îlot même lorsqu'il est protégé par un enrobage d'alginate. De plus, tant à des concentration faibles (0.01 %) qu'à de s concentrations élevées, la PLL favorise la réaction de l'hôte contre les microcapsules. Ces problèmes peuvent être contournés par l'utilisation de microcapsules sans PLL ou par le développement d'un meilleur recouvrement de la couche de PLL. L'étude décrite dans le Chapitre D.5 nous a permis de démontrer que l'ajout d'IGF-II, lors de la période de culture *in vitro*, permet d'améliorer la survie des îlots microencapsulés en diminuant la prédisposition à la nécrose et à l'apoptose. De plus, nous avons démontré que l'amélioration de la qualité de la masse cellulaire *in vitro* provoquait une amélioration de la fonction des îlots microencapsulés *in vivo*. Ceci permet de réduire de moitié, le nombre d'îlots microencapsulés nécessaires pour induire la normoglycémie. L'application clinique de cette méthode pourrait avoir un impact important à court terme.

Cependant, loin de nous, l'idée de prétendre que tout ce qui est rattaché à ce travail de recherche est suffisant pour permettre l'application clinique de la transplantation d'îlots microencapsulés. Pour ce faire, des études portant sur la biologie de l'îlot encapsulé (nutrition et fonction), sur l'immunobiologie de la réaction de l'hôte (rôle de l'immunité acquise et innée), sur la création de meilleurs biomatériaux (durabilité, biocompatibilité et standardisation) et sur la source d'îlots devront être réalisées (xénoîlots et cellules souches). De plus, les succès obtenus devront être confirmés à l'aide d'études précliniques dont les sujets seront des animaux supérieurs (chiens, porc et primates).

Finalement, à la lumière de cette discussion, nous faisons preuve d'un optimisme renouvelé quant à la possibilité de pouvoir, dans un avenir rapproché, offrir la guérison à un jeune patient diabétique en utilisant la transplantation d'îlots microencapsulés.

G. SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Oberholzer, J. *et al.* Current status of islet cell transplantation. *Adv Surg* **37**, 253-82 (2003).
2. Foulis, A.K., Liddle, C.N., Farquharson, M.A., Richmond, J.A. & Weir, R.S. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* **29**, 267-74 (1986).
3. Davies, J.L. *et al.* A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* **371**, 130-136 (1994).
4. Potter, K.N. & Wilkin, T.J. The molecular specificity of insulin autoantibodies. *Diabetes Metab Res Rev* **16**, 338-53 (2000).
5. Verge, C.F. *et al.* Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes* **47**, 1857-66 (1998).
6. Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D. & Pyke, D.A. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* **20**, 87-93 (1981).
7. Yoon, J.W. Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Ann Med* **23**, 437-45 (1991).
8. Luppi, P. & Trucco, M. Immunological models of type 1 diabetes. *Horm Res* **52**, 1-10 (1999).
9. Notkins, A.L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* **277**, 43545-8 (2002).
10. Yoon, J.W., Jun, H.S. & Santamaria, P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* **27**, 109-22 (1998).
11. Green, E.A. & Flavell, R.A. The initiation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol* **11**, 663-9 (1999).
12. Kukreja, A. & Maclaren, N.K. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 4371-8 (1999).

13. Conrad, B. *et al.* Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* **371**, 351-5 (1994).
14. Trudeau, J.D. *et al.* Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* **49**, 1-7 (2000).
15. American Diabetes Association position statement: Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. *Clinical Diabetes* **11**, 91-96 (1993).
16. Tamborlane, W.V. & Ahern, J. Implications and results of the diabetes control and complications trial. *Pediatric Clinics of North America* **44**, 285-300 (1997).
17. Shapiro, A.M. *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* **343**, 230-8. (2000).
18. Ryan, E.A. *et al.* Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* **50**, 710-9. (2001).
19. Benhamou, P.Y. *et al.* Human islet transplantation network for the treatment of Type I diabetes: first data from the Swiss-French GRAGIL consortium (1999-2000). *Diabetologia* **44**, 859-64. (2001).
20. Samuel, T. & Cockwell, P. Islet cell transplantation. *J R Soc Med* **95**, 31-3. (2002).
21. Biancone, L. & Ricordi, C. Pancreatic islet transplantation: an update. *Cell Transplant* **11**, 309-11 (2002).
22. Miyamoto, M. Current progress and perspectives in cell therapy for diabetes mellitus. *Hum Cell* **14**, 293-300. (2001).
23. Rosenberg, L. Pancreatic and islet transplantation. *Curr Gastroenterol Rep* **2**, 165-72. (2000).
24. Rosenberg, L. Clinical islet cell transplantation. Are we there yet? *Int J Pancreatol* **24**, 145-68. (1998).
25. Shapiro, A.M., Ryan, E.A. & Lakey, J.R. Diabetes. Islet cell transplantation. *Lancet* **358 Suppl**, S21. (2001).
26. Oberholzer, J. *et al.* La transplantation d'îlots de Langerhans pour le traitement du diabète. *Bulletin des médecins suisses* **82**, 390-394 (2001).
27. Halle, J.P. *et al.* Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine membranes. *Transplantation* **55**, 350-4. (1993).

28. Soon-Shiong, P., Lu, Z.N., Grewal, I., Lanza, R. & Clark, W. Prevention of CTL and NK cell-mediated cytotoxicity by microencapsulation. *Horm Metab Res Suppl* **25**, 215-9 (1990).
29. Darquy, S. & Reach, G. Immunoisolation of pancreatic B cells by microencapsulation. An in vitro study. *Diabetologia* **28**, 776-80. (1985).
30. Lim, F. & Sun, A.M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* **210**, 908-10. (1980).
31. Aebischer, P. *et al.* A bioartificial parathyroid. *ASAIO Trans* **32**, 134-7. (1986).
32. Chang, T.M. Hybrid artificial cells: microencapsulation of living cells. *Asaio J* **38**, 128-30. (1992).
33. Liu, H.W., Ofosu, F.A. & Chang, P.L. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum Gene Ther* **4**, 291-301. (1993).
34. Koo, J. & Chang, T.M. Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: preliminary results. *Int J Artif Organs* **16**, 557-60. (1993).
35. Chang, P.L., Shen, N. & Westcott, A.J. Delivery of recombinant gene products with microencapsulated cells in vivo. *Hum Gene Ther* **4**, 433-40. (1993).
36. Aebischer, P., Goddard, M., Signore, A.P. & Timpson, R.L. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* **126**, 151-8. (1994).
37. Chick, W.L. *et al.* A hybrid artificial pancreas. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*. **21**, 8-14 (1975).
38. Chick, W.L., Like, A.A. & Lauris, V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* **187**, 847-9. (1975).
39. Uludag, H., De Vos, P. & Tresco, P.A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* **42**, 29-64. (2000).
40. Scharp, D.W., Mason, N.S. & Sparks, R.E. Islet immuno-isolation: the use of hybrid artificial organs to prevent islet tissue rejection. *World J Surg* **8**, 221-9. (1984).
41. Algire, G.H. An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* **4**, 1-11 (1943).
42. Klomp, G.F., Ronel, S.H., Hashiguchi, H., D'Andrea, M. & Dobelle, W.H. Hydrogels for encapsulation of pancreatic islet cells. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **25**, 74-6 (1979).

43. Strautz, R.L. Studies of hereditary-obese mice (obob) after implantation of pancreatic islets in Millipore filter capsules. *Diabetologia* **6**, 306-12. (1970).
44. Storrs, R., Dorian, R., King, S.R., Lakey, J. & Rilo, H. Preclinical development of the Islet Sheet. *Ann N Y Acad Sci* **944**, 252-66. (2001).
45. Archer, J., Kaye, R. & Mutter, G. Control of streptozotocin diabetes in Chinese hamsters by cultured mouse islet cells without immunosuppression: a preliminary report. *J Surg Res* **28**, 77-85. (1980).
46. Zekorn, T. *et al.* Bioartificial pancreas: the use of different hollow fibers as a diffusion chamber. *Transplant Proc* **21**, 2748-50. (1989).
47. Kessler, L., Pinget, M., Aprahamian, M., Dejardin, P. & Damge, C. In vitro and in vivo studies of the properties of an artificial membrane for pancreatic islet encapsulation. *Horm Metab Res* **23**, 312-7. (1991).
48. Lanza, R.P., Kuhlreiber, W.M., Ecker, D.M., Marsh, J.P. & Chick, W.L. Successful bovine islet xenografts in rodents and dogs using injectable microreactors. *Transplant Proc* **27**, 3211. (1995).
49. Chang, T.M.S. Semipermeable microcapsules. *Science* **146**, 524-526 (1964).
50. O'Shea, G.M., Goosen, M.F. & Sun, A.M. Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane. *Biochim Biophys Acta* **804**, 133-6. (1984).
51. Fan, M.Y. *et al.* Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetes* **39**, 519-22. (1990).
52. Soon-Shiong, P. *et al.* Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5843-7. (1993).
53. Soon-Shiong, P. *et al.* Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* **54**, 769-74. (1992).
54. Sun, Y., Ma, X., Zhou, D., Vacek, I. & Sun, A.M. Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression. *J Clin Invest* **98**, 1417-22. (1996).
55. Soon-Shiong, P. *et al.* Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* **343**, 950-1. (1994).
56. Dawson, R.M., Broughton, R.L., Stevenson, W.T. & Sefton, M.V. Microencapsulation of CHO cells in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer. *Biomaterials* **8**, 360-6. (1987).

57. Cruise, G.M. *et al.* In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant* **8**, 293-306. (1999).
58. Zielinski, B.A. & Aebischer, P. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials* **15**, 1049-56. (1994).
59. Iwata, H. *et al.* Evaluation of microencapsulated islets in agarose gel as bioartificial pancreas by studies of hormone secretion in culture and by xenotransplantation. *Diabetes* **38 Suppl 1**, 224-5. (1989).
60. Sefton, M.V. The good, the bad and the obvious: 1993 Clemson Award for Basic Research--Keynote Lecture. *Biomaterials* **14**, 1127-34. (1993).
61. Zimmermann, U., Hasse, C., Rothmund, M. & Kuhlreiber, W. Biocompatible encapsulation materials: Fundamentals and application. in *Cell encapsulation technology and therapeutics* (eds. Kuhlreiber, W.M., Lanza, R.P. & Chick, W.L.) 40-52 (Birkhauser, Boston, 1999).
62. de Vos, P., Hamel, A.F. & Tatarkiewicz, K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* **45**, 159-73. (2002).
63. Dulieu, C., Poncelet, D. & Neufeld, R.J. Encapsulation and immobilization techniques. in *Cell encapsulation technology and therapeutics* (eds. Kuhlreiber, W.M., Lanza, R.P. & Chick, W.L.) 3-17 (Birkhauser, Boston, 1999).
64. Wolters, G.H., Fritschy, W.M., Gerrits, D. & van Schilfgaarde, R. A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. *J Appl Biomater* **3**, 281-6. (1991).
65. Halle, J.P. *et al.* Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* **3**, 365-72. (1994).
66. Bystricky, S., Malovikova, A. & Sticzay, T. Interaction of alginates and pectines with cationic polypeptides. *Carbohydrate Polymers* **13**, 283-294 (1990).
67. Duvivier-Kali, V.F., Omer, A., Parent, R.J., O'Neil, J.J. & Weir, G.C. Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane. *Diabetes* **50**, 1698-705. (2001).
68. Zekorn, T. *et al.* Barium-alginate beads for immunoisolated transplantation of islets of Langerhans. *Transplant Proc* **24**, 937-9. (1992).

69. Ma, X., Vacek, I. & Sun, A. Generation of alginate-poly-l-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* **22**, 43-69 (1994).
70. Lacik, I., Brissova, M., Anilkumar, A.V., Powers, A.C. & Wang, T. New capsule with tailored properties for the encapsulation of living cells. *J Biomed Mater Res* **39**, 52-60. (1998).
71. King, G.A., Daugulis, A.J., Faulkner, P. & Goosen, M.F.A. Alginate-polylysine microcapsules of controlled membrane molecular weight cutoff for mammalian cell culture engineering. *Biotechnology Progress* **3**, 231-240 (1987).
72. Matthew, H.W., Salley, S.O., Peterson, W.D. & Klein, M.D. Complex coacervate microcapsules for mammalian cell culture and artificial organ development. *Biotechnol Prog* **9**, 510-9. (1993).
73. Leblond, F.A., Tessier, J. & Halle, J.P. Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress. *Biomaterials* **17**, 2097-102. (1996).
74. Lee, C.S. & Chu, I.M. Characterization of modified alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Artif Organs* **21**, 1002-6. (1997).
75. Peirone, M., Ross, C.J., Hortelano, G., Brash, J.L. & Chang, P.L. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res* **42**, 587-96. (1998).
76. Brissova, M., Lacik, I., Powers, A.C., Anilkumar, A.V. & Wang, T. Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system. *J Biomed Mater Res* **39**, 61-70. (1998).
77. Crooks, C.A., Douglas, J.A., Broughton, R.L. & Sefton, M.V. Microencapsulation of mammalian cells in a HEMA-MMA copolymer: effects on capsule morphology and permeability. *J Biomed Mater Res* **24**, 1241-62. (1990).
78. Vandenbossche, G.M., Van Oostveldt, P. & Remon, J.P. A fluorescence method for the determination of the molecular weight cut-off of alginate-polylysine microcapsules. *J Pharm Pharmacol* **43**, 275-7. (1991).
79. Vandenbossche, G.M.R., Van Oostveldt, P., Demeester, J. & Remon, J.-P. The molecular weight cut-off of microcapsules is determined by the reaction between alginate and polylysine. *Biotechnology and Bioengineering* **42**, 381-386 (1993).
80. Halle, J.P., Leblond, F.A., Landry, D., Fournier, A. & Chevalier, S. Studies of 300-microns microcapsules: I. Use of arginine esterase release by microencapsulated

- prostatic cells as a measure of membrane permeability. *Transplant Proc* **24**, 2930-2. (1992).
81. Brissova, M., Petro, M., Lacik, I., Powers, A.C. & Wang, T. Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Anal Biochem* **242**, 104-11. (1996).
 82. Cole, D.R., Waterfall, M., McIntyre, M. & Baird, J.D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* **35**, 231-7. (1992).
 83. Fritschy, W.M. *et al.* The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats. *Transpl Int* **7**, 264-71. (1994).
 84. Wijsman, J. *et al.* Histological and immunopathological analysis of recovered encapsulated allogeneic islets from transplanted diabetic BB/W rats. *Transplantation* **54**, 588-92. (1992).
 85. Siebers, U. *et al.* Morphological studies on biocompatibility of artificial membranes for immunoisolated islet transplantation. *Horm Metab Res Suppl* **25**, 206-8 (1990).
 86. Zekorn, T.D.C. & Bretzel, R.G. Immunoprotection of islets of Langerhans by microencapsulation in barium alginate beads. in *Cell encapsulation technology and therapeutics* (eds. Kuhtreiber, W.M., Lanza, R.P. & Chick, W.L.) 90-96 (Birkhauser, Boston, 1999).
 87. De Vos, P., De Haan, B.J., Wolters, G.H., Strubbe, J.H. & Van Schilfgaarde, R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* **40**, 262-70. (1997).
 88. De Vos, P., Wolters, G.H., Fritschy, W.M. & Van Schilfgaarde, R. Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation. *Int J Artif Organs* **16**, 205-12. (1993).
 89. De Vos, P. *et al.* Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes* **48**, 1381-8. (1999).
 90. Otterlei, M. *et al.* Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *J Immunother* **10**, 286-91. (1991).
 91. De Vos, P., De Haan, B. & Van Schilfgaarde, R. Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules. *Biomaterials* **18**, 273-8. (1997).

92. Zimmermann, U. *et al.* Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* **13**, 269-74. (1992).
93. Klock, G. *et al.* Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* **40**, 638-43. (1994).
94. Prokop, A. & Wang, T.G. Purification of polymers used for fabrication of an immunoisolation barrier. *Ann N Y Acad Sci* **831**, 223-31. (1997).
95. van Schilfgaarde, R. & de Vos, P. Aspects of immunoprotection of islets. *Transplant Proc* **28**, 3516-7. (1996).
96. Korbitt, G.S. *et al.* Microencapsulation of neonatal porcine islets: long-term reversal of diabetes in nude mice and in vitro protection from human complement mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* **29**, 2128. (1997).
97. De Vos, P., De Haan, B., Wolters, G.H. & Van Schilfgaarde, R. Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* **62**, 888-93. (1996).
98. De Vos, P., De Haan, B., Pater, J. & Van Schilfgaarde, R. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* **62**, 893-9. (1996).
99. Colton, C.K. & Avgoustiniatos, E.S. Bioengineering in development of the hybrid artificial pancreas. *J Biomech Eng* **113**, 152-70. (1991).
100. Lum, Z.P. *et al.* Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. *Diabetes* **40**, 1511-6. (1991).
101. Lanza, R.P. *et al.* Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/Wor rats without immunosuppression. *Endocrinology* **131**, 637-42. (1992).
102. Petruzzo, P. *et al.* Development of biocompatible barium alginate microcapsules. *Transplant Proc* **29**, 2129-30. (1997).
103. Soon-Shiong, P. *et al.* An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules. *Transplant Proc* **23**, 758-9. (1991).
104. King, A., Sandler, S. & Andersson, A. The effect of host factors and capsule composition on the cellular overgrowth on implanted alginate capsules. *J Biomed Mater Res* **57**, 374-83. (2001).

105. King, A. Microencapsulation of islets of Langerhans: impact of cellular overgrowth. *Ups J Med Sci* **106**, 161-74 (2001).
106. Strand, B.L. *et al.* Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant* **10**, 263-75 (2001).
107. Robitaille, R. *et al.* Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules. *J Biomed Mater Res* **44**, 116-20. (1999).
108. Gill, R.G. Use of small animal models for screening immunoisolation approaches to cellular transplantation. *Ann N Y Acad Sci* **944**, 35-46. (2001).
109. Gray, D.W. An overview of the immune system with specific reference to membrane encapsulation and islet transplantation. *Ann N Y Acad Sci* **944**, 226-39. (2001).
110. Gray, D.W. Encapsulated islet cells: the role of direct and indirect presentation and the relevance to xenotransplantation and autoimmune recurrence. *Br Med Bull* **53**, 777-88 (1997).
111. Lanza, R.P., Beyer, A.M. & Chick, W.L. Xenogenic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers. *Transplantation* **57**, 1371-5. (1994).
112. Colton, C.K. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant* **4**, 415-36. (1995).
113. Fraser, R.B., MacAulay, M.A., Wright, J.R., Jr., Sun, A.M. & Rowden, G. Migration of macrophage-like cells within encapsulated islets of Langerhans maintained in tissue culture. *Cell Transplant* **4**, 529-34. (1995).
114. Weber, C.J. *et al.* The role of CD4⁺ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice. *Transplantation* **49**, 396-404. (1990).
115. Weber, C., Ayres-Price, J., Costanzo, M., Becker, A. & Stall, A. NOD mouse peritoneal cellular response to poly-L-lysine-alginate microencapsulated rat islets. *Transplant Proc* **26**, 1116-9. (1994).
116. Zekorn, T.D. *et al.* Biocompatibility and immunology in the encapsulation of islets of Langerhans (bioartificial pancreas). *Int J Artif Organs* **19**, 251-7. (1996).
117. Horcher, A. *et al.* Transplantation of microencapsulated islets in rats: evidence for induction of fibrotic overgrowth by islet alloantigens released from microcapsules. *Transplant Proc* **26**, 784-6. (1994).

118. Fritschy, W.M., Wolters, G.H. & van Schilfgaarde, R. Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets. *Diabetes* **40**, 37-43. (1991).
119. King, A., Andersson, A. & Sandler, S. Cytokine-induced functional suppression of microencapsulated rat pancreatic islets in vitro. *Transplantation* **70**, 380-3. (2000).
120. Sandler, S. *et al.* Assessment of insulin secretion in vitro from microencapsulated fetal porcine islet-like cell clusters and rat, mouse, and human pancreatic islets. *Transplantation* **63**, 1712-8. (1997).
121. Tatarkiewicz, K. *et al.* C-peptide responses after meal challenge in mice transplanted with microencapsulated rat islets. *Diabetologia* **44**, 646-53. (2001).
122. Clayton, H.A., London, N.J., Colloby, P.S., Bell, P.R. & James, R.F. A study of the effect of capsule composition on the viability of cultured alginate/poly-l-lysine--encapsulated rat islets. *Diabetes Res* **14**, 127-32. (1990).
123. Lum, Z.P., Krestow, M., Tai, I.T., Vacek, I. & Sun, A.M. Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules. *Transplantation* **53**, 1180-3. (1992).
124. Darquy, S., Chicheportiche, D., Capron, F., Boitard, C. & Reach, G. Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different diabetic models in mice. *Horm Metab Res Suppl* **25**, 209-13 (1990).
125. Mazaheri, R. *et al.* Transplantation of encapsulated allogeneic islets into diabetic BB/W rats. Effects of immunosuppression. *Transplantation* **51**, 750-4. (1991).
126. Morgan, B.P. The complement system: an overview. *Methods Mol Biol* **150**, 1-13 (2000).
127. Rayat, G.R., Rajotte, R.V., Ao, Z. & Korbitt, G.S. Microencapsulation of neonatal porcine islets: protection from human antibody/complement-mediated cytolysis in vitro and long-term reversal of diabetes in nude mice. *Transplantation* **69**, 1084-90. (2000).
128. Darquy, S., Pueyo, M.E., Capron, F. & Reach, G. Complement activation by alginate-polylysine microcapsules used for islet transplantation. *Artif Organs* **18**, 898-903. (1994).
129. Heald, K.A., Jay, T.R. & Downing, R. Assessment of the reproducibility of alginate encapsulation of pancreatic islets using the MTT colorimetric assay. *Cell Transplant* **3**, 333-7. (1994).

130. De Vos, P., Van Hoogmoed, C.G., De Haan, B.J. & Busscher, H.J. Tissue responses against immunoisolating alginate-PLL capsules in the immediate posttransplant period. *J Biomed Mater Res* **62**, 430-7. (2002).
131. Babensee, J.E., Cornelius, R.M., Brash, J.L. & Sefton, M.V. Immunoblot analysis of proteins associated with HEMA-MMA microcapsules: human serum proteins in vitro and rat proteins following implantation. *Biomaterials* **19**, 839-49. (1998).
132. Tang, L. & Eaton, J.W. Fibrin(ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials. *J Exp Med* **178**, 2147-56. (1993).
133. Tang, L. & Eaton, J.W. Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions. *Mol Med* **5**, 351-8. (1999).
134. Kovacs, E.J. & DiPietro, L.A. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *Faseb J* **8**, 854-61. (1994).
135. Kovacs, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunol Today* **12**, 17-23. (1991).
136. Henley, N., Robitaille, R. & Halle, J.P. Time course of peritoneal cellular host reaction against alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Canadian Journal of Diabetes Care* **23**, 98 (1999).
137. Siebers, U. *et al.* Analysis of the cellular reaction towards microencapsulated xenogeneic islets after intraperitoneal transplantation. *J Mol Med* **77**, 215-8. (1999).
138. Robitaille, R. *et al.* Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: a novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates. *J Biomed Mater Res* **45**, 223-30. (1999).
139. Vandenbossche, G.M. *et al.* Host reaction against empty alginate-polylysine microcapsules. Influence of preparation procedure. *J Pharm Pharmacol* **45**, 115-20. (1993).
140. Vandenbossche, G.M. *et al.* Host reaction against alginate-polylysine microcapsules containing living cells. *J Pharm Pharmacol* **45**, 121-5 (1993).
141. Hsu, B.R. *et al.* The plasminogen-plasmin fibrinolytic system accelerates degradation of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules in vitro. *Transplant Proc* **29**, 1877-80. (1997).
142. Robitaille, R., Henley, N., Prud'homme, G.J., Drobetsky, E. & Halle, J.P. Time course of TGF-beta 1 mRNA expression in the host reaction to alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Canadian Journal of Diabetes Care* **23**, 98 (1999).

143. King, A. *et al.* Glucose metabolism in vitro of cultured and transplanted mouse pancreatic islets microencapsulated by means of a high-voltage electrostatic field. *Diabetes Care* **22 Suppl 2**, B121-6. (1999).
144. Border, W.A. & Noble, N.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**, 1286-92. (1994).
145. Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., McGrouther, G. & Laurent, G.J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 5-17. (1997).
146. Pierce, G.F. *et al.* Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* **140**, 1375-88. (1992).
147. Pueyo, M.E., Darquy, S., Capron, F. & Reach, G. In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules. *J Biomater Sci Polym Ed* **5**, 197-203 (1993).
148. Kulseng, B., Thu, B., Espevik, T. & Skjak-Braek, G. Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane. *Cell Transplant* **6**, 387-94. (1997).
149. Tai, I.T., Vacek, I. & Sun, A. The alginate-polylysine-alginate membrane: Evidence of a protective effect on microencapsulated islets of Langerhans following exposure to cytokines. *Xenotransplantation* **2**, 37-45 (1995).
150. De Vos, P. *et al.* Kinetics of intraperitoneally infused insulin in rats. Functional implications for the bioartificial pancreas. *Diabetes* **45**, 1102-7. (1996).
151. Schrezenmeir, J. *et al.* Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* **57**, 1308-14. (1994).
152. Renvall, S. & Niinikoski, J. Intraperitoneal oxygen and carbon dioxide tensions in experimental adhesion disease and peritonitis. *Am J Surg* **130**, 286-92. (1975).
153. Schrezenmeir, J., Velten, F. & Beyer, J. Immobilized hemoglobin improves islet function and viability in the bioartificial pancreas in vitro and in vivo. *Transplant Proc* **26**, 792-800. (1994).
154. Hsu, B.R., Fu, S.H., Huang, Y.Y., Chen, H.C. & Huang, H.S. Prolonged postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice after intraperitoneal treatment with microencapsulated islets. *Transplant Proc* **26**, 3706-8. (1994).

155. Leblond, F.A. *et al.* Studies on smaller (approximately 315 microm) microcapsules: IV. Feasibility and safety of intrahepatic implantations of small alginate poly-L-lysine microcapsules. *Cell Transplant* **8**, 327-37. (1999).
156. Alejandro, R. *et al.* Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *J Clin Invest* **78**, 1339-48. (1986).
157. Davalli, A.M. *et al.* A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. *Transplantation* **59**, 817-20. (1995).
158. Paraskevas, S. *et al.* Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. *Transplant Proc* **29**, 750-2. (1997).
159. Paraskevas, S., Maysinger, D., Wang, R., Duguid, T.P. & Rosenberg, L. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas* **20**, 270-6. (2000).
160. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. & Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **270**, 1326-31. (1995).
161. Kyriakis, J.M. *et al.* The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-60. (1994).
162. Kummer, J.L., Rao, P.K. & Heidenreich, K.A. Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**, 20490-4. (1997).
163. Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S. & Yamada, K.M. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* **135**, 1633-42. (1996).
164. Zhu, X. & Assoian, R.K. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* **6**, 273-82. (1995).
165. Paraskevas, S. *et al.* Activation and expression of ERK, JNK, and p38 MAP-kinases in isolated islets of Langerhans: implications for cultured islet survival. *FEBS Lett* **455**, 203-8. (1999).
166. Rosenberg, L., Wang, R., Paraskevas, S. & Maysinger, D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* **126**, 393-8. (1999).
167. Meredith, J.E. & Schwartz, M.A. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends in Cell Biology* **7**, 146-150 (1997).

168. Wang, R.N. & Rosenberg, L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* **163**, 181-90. (1999).
169. Githens, S. Differentiation and development of the pancreas in animals. in *The pancreas: biology, pathobiology and disease* (eds. Go, V.L. *et al.*) 21-55 (Raven Press, New York, 1993).
170. Rosenberg, L., Clas, D. & Duguid, W.P. Trophic stimulation of the ductal/islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. *Surgery* **108**, 191-7. (1990).
171. Rosenberg, L., Duguid, W.P., Healy, M., Clas, D. & Vinik, A.I. Reversal of diabetes by the induction of islet cell neogenesis. *Transplant Proc* **24**, 1027-8. (1992).
172. Metrakos, P., Yuan, S., Agapitos, D. & Rosenberg, L. Intercellular communication and maintenance of islet cell mass--implications for islet transplantation. *Surgery* **114**, 423-7; discussion 427-8. (1993).
173. Ilieva, A. *et al.* Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* **161**, 357-64. (1999).
174. Sporn, M.B. & Roberts, A.B. Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* **332**, 217-9. (1988).
175. Collins, M.K., Perkins, G.R., Rodriguez-Tarduchy, G., Nieto, M.A. & Lopez-Rivas, A. Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis. *Bioessays* **16**, 133-8. (1994).
176. Barres, B.A. *et al.* Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* **70**, 31-46. (1992).
177. Geier, A., Haimshon, M., Beery, R., Hemi, R. & Lunenfeld, B. Insulinlike growth factor-1 inhibits cell death induced by cycloheximide in MCF-7 cells: a model system for analyzing control of cell death. *In Vitro Cell Dev Biol* **28A**, 725-9. (1992).
178. Chun, S.Y. *et al.* Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* **135**, 1845-53. (1994).
179. Galli, C. *et al.* Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* **15**, 1172-9. (1995).

180. Muta, K. & Krantz, S.B. Apoptosis of human erythroid colony-forming cells is decreased by stem cell factor and insulin-like growth factor I as well as erythropoietin. *J Cell Physiol* **156**, 264-71. (1993).
181. Petrik, J., Arany, E., McDonald, T.J. & Hill, D.J. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* **139**, 2994-3004. (1998).
182. Hill, D.J. *et al.* Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology* **141**, 1151-7. (2000).
183. Winkler, R., Pasleau, F., Boussif, N. & Hodzic, D. [The IGF system: summary and recent data]. *Rev Med Liege* **55**, 725-39. (2000).
184. D'Ercole, A.J. Insulin-like growth factors and their receptors in growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25**, 573-90. (1996).
185. LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D. & Roberts, C.T., Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* **16**, 143-63. (1995).
186. Collett-Solberg, P.F. & Cohen, P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am* **25**, 591-614. (1996).
187. Jones, J.I. & Clemmons, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* **16**, 3-34. (1995).
188. Rajaram, S., Baylink, D.J. & Mohan, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* **18**, 801-31. (1997).
189. Hill, D.J., Frazer, A., Swenne, I., Wirdnam, P.K. & Milner, R.D. Somatomedin-C in human fetal pancreas. Cellular localization and release during organ culture. *Diabetes* **36**, 465-471 (1987).
190. Romanus, J.A., Rabinovitch, A. & Rechler, M.M. Neonatal rat islet cell cultures synthesize insulin-like growth factor I. *Diabetes* **34**, 696-702 (1985).
191. Hogg, J., Hill, D.J. & Han, V.K.M. The ontogeny of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein gene expression in the rat pancreas. *Journal of Molecular Endocrinology* **13**, 49-58 (1994).

192. Withers, D.J. & White, M. Perspective: the insulin signaling system. A common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* **141**, 1917-1921 (2000).
193. Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L. & Butler, A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* **22**, 53-74. (2001).
194. Rhodes, C.J. IGF-I and GH post-receptor signaling mechanisms for pancreatic beta-cell replication. *J Mol Endocrinol* **24**, 303-11. (2000).
195. Peruzzi, F. *et al.* Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* **19**, 7203-15. (1999).
196. De Vos, P. & Van Schilfgaarde, R. Biocompatibility issues. in *Cell encapsulation technology and therapeutics* (eds. Kuhlreiber, W.M., Lanza, R.P. & Chick, W.L.) 63-75 (Birkhauser, Boston, 1999).
197. Clayton, H.A., London, N.J., Colloby, P.S., Bell, P.R. & James, R.F. The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-l-lysine capsules. *J Microencapsul* **8**, 221-33. (1991).
198. Tang, L., Jennings, T.A. & Eaton, J.W. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8841-6. (1998).
199. Falck, P. Characterization of human neutrophils adherent to organic polymers. *Biomaterials* **16**, 61-6. (1995).
200. Anderson, J.M. & Miller, K.M. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* **5**, 5-10. (1984).
201. Anderson, J.M. Inflammatory response to implants. *ASAIO Trans* **34**, 101-7. (1988).
202. Ziats, N.P., Miller, K.M. & Anderson, J.M. In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* **9**, 5-13. (1988).
203. Hsu, B.R., Chang, F.H., Juang, J.H., Huang, Y.Y. & Fu, S.H. The rescue effect of 15-deoxyspergualin on intraperitoneal microencapsulated xenoislets. *Cell Transplant* **8**, 307-15. (1999).
204. Fernandez-Alvarez, J., Tomas, C., Casamitjana, R. & Gomis, R. Nuclear response of pancreatic islets to interleukin-1 beta. *Mol Cell Endocrinol* **103**, 49-55. (1994).
205. Mandrup-Poulsen, T. *et al.* Islet cytotoxicity of interleukin 1. Influence of culture conditions and islet donor characteristics. *Diabetes* **36**, 641-7. (1987).
206. Palmer, J.P. *et al.* Interaction of beta-cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* **38**, 1211-6. (1989).

207. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shi, Y., Morgan, A.R. & Bleackley, R.C. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* **37**, 733-8. (1994).
208. Spinas, G.A. *et al.* Low concentrations of interleukin-1 stimulate and high concentrations inhibit insulin release from isolated rat islets of Langerhans. *Acta Endocrinol (Copenh)* **113**, 551-8. (1986).
209. Gill, R.G. Antigen presentation pathways for immunity to islet transplants. Relevance to immunoisolation. *Ann N Y Acad Sci* **875**, 255-60 (1999).
210. Sutherland, D.E.R. *et al.* Twin-to-twin pancreas transplantation: reversal and reenactment of the pathogenesis of type I diabetes. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **97**, 80-87 (1984).
211. Naji, A. *et al.* Prevention of diabetes in rats by bone marrow transplantation. *Annals of Surgery* **194**, 328-338 (1981).
212. Orive, G. *et al.* Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* **9**, 104-7 (2003).
213. de Vos, P., Hoogmoed, C.G. & Busscher, H.J. Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells. *J Biomed Mater Res* **60**, 252-9. (2002).
214. Goosen, M.F.A., King, G.A., McKnight, C.A. & Marcotte, N. Animal cell culture engineering using alginate polycation microcapsules of controlled membrane molecular weight cut-off. *Journal of Membrane Science* **41**, 323-343 (1987).
215. Leung, Y.F., O'Shea, G.M., Goosen, M.F.A. & Sun, A.M. Microencapsulation of crystalline insulin or islets of Langerhans : An insulin diffusion study. *Artificial Organs* **7**, 208-212 (1983).
216. Thu, B. *et al.* Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* **17**, 1031-40. (1996).
217. Thu, B. *et al.* Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* **17**, 1069-79. (1996).
218. Yang, H. & Wright, J.R., Jr. Co-encapsulation of Sertoli enriched testicular cell fractions further prolongs fish-to-mouse islet xenograft survival. *Transplantation* **67**, 815-20. (1999).
219. Gainer, A.L. *et al.* Improved survival of biolistically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble FAS ligand. *Transplantation* **66**, 194-199 (1998).

220. Weber, C.J. *et al.* CTLA4-Ig prolongs survival of microencapsulated neonatal porcine islet xenografts in diabetic nod mice. *Cell Transplantation* **6**, 505-508 (1997).
221. Zekorn, T. *et al.* Alginate coating of islets of Langerhans: in vitro studies on a new method for microencapsulation for immuno-isolated transplantation. *Acta Diabetol* **29**, 41-5 (1992).
222. Giannoukakis, N. *et al.* Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Ther* **7**, 2015-22. (2000).
223. Thomas, F.T. *et al.* Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* **126**, 299-304. (1999).
224. Check, E. Diabetes trial stirs debate on safety of xenotransplants. *Nature* **419**, 5 (2002).
225. Valdes, R. Xenotransplantation trials. *Lancet* **359**, 2281 (2002).

ANNEXES